



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA
TROPICAL**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES
CLINICAMENTE RELEVANTES DE *ASPERGILLUS***

Marisa Isabel Benedita Simões Elói



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA
TROPICAL**



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES CLINICAMENTE RELEVANTES DE *ASPERGILLUS*

Marisa Isabel Benedita Simões Elói

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas,
especialidade de Biologia Molecular
em Medicina Tropical e Internacional*

**Orientador: Investigadora Doutora Maria da Luz Martins
Co-Orientador: Doutor João Inácio Silva**

2009

Índice Geral

Índice geral	III
Índice de figuras	V
Índice de tabelas	VI
Lista de abreviaturas	VII
Resumo	VIII
Abstract	IX

Capítulo I.....	1
1.1. Introdução geral	2
1.1.1. Introdução histórica à micologia médica	2
1.1.2 – O género <i>Aspergillus</i>	4
1.1.3. Classificação do género <i>Aspergillus</i>	5
1.1.4 – Relevância clínica do género <i>Aspergillus</i>	7
<i>Aspergilose broncopulmonar alérgica</i>	8
<i>Aspergilose cutânea</i>	9
<i>Aspergiloma pulmonar e aspergilose semi-invasiva</i>	9
<i>Aspergilose pulmonar invasiva aguda</i>	10
Relação da infecção por <i>Aspergillus</i> com a imunodeficiência	12
1.1.5 – Antifúngicos	13
1.1.6. Diagnóstico de fungos do género <i>Aspergillus</i>	13
Métodos tradicionais de diagnóstico	14
Métodos moleculares de diagnóstico.....	17
1.1.7 – Objectivos do estudo e plano da dissertação.....	18
Capítulo II.....	20
2.1. Introdução	21
2.1.1. A parede celular dos fungos do género <i>Aspergillus</i>	21
2.1.2. Métodos usados para a extracção de DNA genómico de <i>Aspergillus</i>	22
2.1.3. Objectivo do trabalho deste capítulo	25
2.2. Materiais e Métodos	27
2.2.2. Métodos de extracção de DNA genómico.....	28
Método TL	28
Método TL modificado.....	28
Método TE fenol.....	29
Método AZ.....	29
2.2.3. Avaliação da eficiência dos métodos de extracção de DNA.....	30
2.3. Resultados e Discussão	31
Capítulo III.....	37
3.1. Introdução	38
3.1.1. Identificação molecular de fungos do género <i>Aspergillus</i>	38
3.1.2. Objectivos dos trabalhos deste capítulo	40
3.2. Materiais e Métodos	41
3.2.1. Selecção das espécies de <i>Aspergillus</i> clinicamente relevantes.....	41
3.2.2. Desenho de <i>primers</i> específicos	41
3.2.3. Espécies e estirpes utilizadas neste trabalho	42
3.2.4. Extracção de DNA	42
3.2.5. Reacções de PCR	42
3.3. Resultados e Discussão	43

Capítulo IV	48
4.1 Considerações finais	49
Referências Bibliográficas	51

Índice de Figuras

Fig. 1.1. Ilustração de um “aspergillum”, usado na liturgia para aspergir água benta e da morfologia de um <i>Aspergillus</i> spp.....	2
Fig. 1.2. Imagem ilustrativa da estrutura de frutificação típica de <i>Aspergillus</i>	5
Fig. 1.3. Aspergilose pulmonar em doente transplantado. Observa-se uma maior expressividade radiográfica na TAC do que na radiografia simples	11
Fig. 1.4. Figuras ilustrativas de culturas de <i>Aspergillus</i>	16
Fig. 1.5. Morfologia microscópica de <i>Aspergillus fumigatus</i> e esquema ilustrativo das estruturas de <i>Aspergillus</i>	17
Fig. 2.1. Ilustração dos resultados obtidos em reacções de PCR com os <i>primers</i> universais para fungos ITS1 e ITS4, usando como DNA molde as soluções extraídas com o método TL modificado.....	32
Fig. 2.2. Ilustração dos resultados obtidos em reacções de PCR com os <i>primers</i> universais para fungos ITS1 e ITS4, usando como DNA molde as soluções extraídas com o método TE fenol.....	33
Fig. 2.3. Ilustração das bandas de DNA de elevado peso molecular, correspondentes ao DNA genómico extraído com o método AZ, após migração num gel de electroforese.....	34
Fig. 2.4. Comparação dos tempos experimentais para a execução de cada um dos quatro métodos de extracção de DNA testados neste trabalho.....	34
Fig. 3.1. Resultado da amplificação com os <i>primers</i> universais ITS1 e ITS4 a partir das soluções de DNA das várias estirpes de <i>Aspergillus</i> em estudo.....	44
Fig. 3.2. Reacções de PCR com o <i>primer</i> específico e o respectivo <i>primer</i> universal em misturas reaccionais separadas.....	46

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Comparação entre métodos comerciais de extracção de DNA.....	24
Tabela 2.2. Estirpes e espécies de <i>Aspergillus</i> utilizadas neste trabalho.....	27
Tabela 3.1. <i>Primers</i> desenhados neste trabalho, com base na região ITS, para espécies de <i>Aspergillus</i> clinicamente relevantes.....	43

Lista de abreviaturas

A. – *Aspergillus*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DPOC – Doença Pulmonar Crónica Obstrutiva
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
FDNA – *FastDNA*
Fig. – Figura
h – hora(s)
HCl – Ácido clorídrico
HSCT – Transplante de células tronco hematopoiéticas
IgE – Imunoglobulina E
ITS – *Internal Transcribed Spacer*
LBA – Lavado broncoalveolar
LCR – Líquido cefalorraquidiano
MPPL – *MasterPure plant leaf DNA purification*
MPY – *MasterPure yeast DNA purification*
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
PCR – Reacção de Polimerização em Cadeia
PVPP – *Polyvinyl polypyrrolone*
rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossómico
RNA – Ácido ribonucleico
rpm – Rotações por minuto
SDS – *Sodium dodecylsulphate*
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SM – *SoilMaster DNA extraction*
SNC – Sistema Nervoso Central
TAC – Tomografia Axial Computorizada
TBE – Tampão Tris, Ácido bórico e EDTA
TE – Tampão Tris e EDTA
UCS – *UltraClean DNA isolation*
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana
YL-GNOME – *Yeast cell lysis preparatin plus GNOME*
YM – Extracto de levedura

Resumo

As aspergiloses são cada vez mais diagnosticadas em todo o mundo, nas suas diversas formas de apresentação, tanto pelo aumento da população susceptível como pela melhoria dos métodos de diagnóstico laboratorial. Estas infecções fúngicas são causadas por algumas espécies do género *Aspergillus*. A espécie *A. fumigatus* continua a ser a causa mais frequente de Aspergilose Invasiva. No entanto, outras espécies como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. versicolor* têm sido relacionadas com patologias no Homem. Estão descritos diversos casos em que estas espécies se têm tornado resistentes à medicação e, por esta razão, tem sido também muito importante a sua rápida e correcta identificação. Um grande número de indivíduos é passível de cura após um diagnóstico nas fases iniciais da infecção e após aplicação dos tratamentos mais adequados. Actualmente, as técnicas convencionais de diagnóstico são morosas devido ao facto do fungo *Aspergillus* demorar vários dias a crescer. Em adição, a identificação do fungo é depois muitas vezes dificultada devido à ambiguidade de muitas das características fenotípicas usadas na delimitação das espécies.

O principal objectivo deste trabalho foi desenvolver um método baseado em PCR que permitisse identificar as principais espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. versicolor*. O primeiro passo foi otimizar um método de extracção de DNA genómico mais eficiente para estas espécies, tarefa que se revelou bem mais complexa e demorada do que o inicialmente previsto. O segundo passo envolveu o desenho de sistemas de *primers* específicos para cada espécie, baseados na análise das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacers* 1 e 2 e região 5.8S) do seu genoma, e a sua utilização em reacções de PCR. Os resultados preliminares obtidos com os *primers* desenhados revelaram-se promissores para a identificação das várias espécies, mas as reacções de PCR requerem ainda alguma optimização para melhoramento da sua especificidade. A utilização futura destes *primers* em reacções de PCR-*multiplex* para a identificação simultânea das várias espécies de *Aspergillus* poderá assim vir a ser possível.

Abstract

The aspergillosis are more than ever diagnosed all over the world being presented in several ways, this is due to the sensitive population as well as better laboratory diagnostic methods. These yeast infections are caused by certain species of *Aspergillus* genus. The specie *A. fumigatus* still continues to be the most frequent cause of Invasive Aspergillosis. Other species such as *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. versicolor* have been related to the pathologies in Man. There are certain written cases where these species have become resistant to medication and for this reason has also been very important to identify it quickly and correct. A huge number of patients are able to be cured if it is diagnosed from an early stage of the infection and after applying adequate treatment. The present conventional diagnostic techniques last a long time due to the fact the *Aspergillus* fungi take several days to grow. In addition to this the identification of the fungi is also very difficult due the ambiguous phenotypic characteristics used in species definition.

The aim of this work was to develop a method based on PCR which would allow us to identify the species of *Aspergillus* relevant to main clinics. The first step was to optimize the extraction of genomic DNA method which would be more efficient for these species. This task became more complex and took longer than initially foreseen. The second step involved the design of specific primers for each specie based on ITS regions (*Internal Transcribed Spacers* 1 and 2 and region 5.8S) analyses of its genome, as well as their use in PCR reactions. The preliminary results obtained with the designed primers revealed to be promising for the identification of these several species, although PCR reactions still require further optimization. The future use of these primers in PCR-multiplex reactions for the simultaneous identification of several *Aspergillus* species will be possible.

CAPÍTULO I

Introdução Geral

Capítulo I

1.1. Introdução geral

1.1.1. Introdução histórica à micologia médica

O estudo da Micologia começou efectivamente aquando da invenção do microscópio composto. Robert Hooke, em 1667, foi o primeiro a observar um fungo através do microscópio. Afirmou na altura que os fungos surgiram em partes de plantas que estavam a secar, em forma de geração espontânea, mas foi cuidadoso em não ser dogmático em relação a este assunto. Em 1689, Leeuwenhoek observou células de leveduras a gemular. Em 1729, o padre italiano Pier Antonio Michelli ilustrou e descreveu pormenorizadamente espécies de *Aspergillus* e *Botrytis* e de outros cerca de 900 fungos, sendo considerado o pai da Micologia. Michelli sugeriu que estes organismos eram independentes e estudou o papel dos seus esporos. Descreveu na altura o estado assexuado de um fungo que produzia cadeias de esporos que irradiavam a partir de estruturas centrais, dando-lhe o nome de *Aspergillus*. Esta designação deveu-se à semelhança que tais estruturas apresentavam com o “aspergillum”, um instrumento utilizado para aspergir água benta em cerimónias religiosas (Fig. 1.1). Somente muito mais tarde este fungo veio a ser considerado o agente etiológico de diversas micoses (Lopes *et al.* 2004).

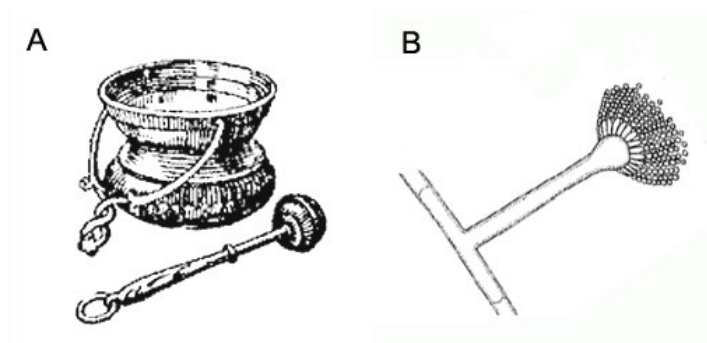


Fig. 1.1. Ilustração de um “aspergillum”, usado na liturgia para aspergir água benta (A) e da morfologia de um *Aspergillus* spp. (B)

No século seguinte, um dos melhores estudos sobre fungos estava relacionado com patologias em plantas. Em 1750, a Academia de Artes e Ciência de Bordéus ofereceu um prémio para o melhor trabalho sobre a doença do enegrecimento do trigo. Mathieu Tillet aceitou o desafio e venceu o prémio, apesar de não ter na altura qualquer formação em agricultura ou botânica. Desenvolveu experiências que testaram todas as teorias conhecidas na altura sobre a doença. O género do fungo causador da doença foi mais tarde chamado de *Tilletia*, em sua homenagem (Espinel-Ingroff 1996).

O estudo dos fungos foi sempre considerado secundário até ao século XIX. Em 1834, o cientista italiano Bassi descobriu que a doença muscardina, que assolou a indústria do “bicho-da-seda” na Europa, era causada por um fungo parasítico (actualmente designado de *Beauveria*). Esta foi uma das primeiras demonstrações de infecção microbiana na Natureza. Pouco depois, em 1839, foi descoberto o primeiro “germe” a provocar uma doença em humanos. A doença era conhecida por tinha favosa e afectava o couro cabeludo, provocada por um fungo designado *Trichophyton* (Espinel-Ingroff 1996).

Alexander Fleming observou, em 1928, que uma das suas culturas da bactéria *Staphylococcus aureus* tinha sido contaminada por esporos de um fungo transportado pelo ar. Observou que em redor das colónias do fungo, identificado como *Penicillium notatum*, o crescimento da cultura da bactéria era inibido. Denominou a substância anti-bacteriana produzida pelo fungo de penicilina, mas não conseguiu isolar o respectivo princípio activo. Só mais tarde, em 1940, Florey e Chain conseguiram isolar e purificar a penicilina, depois reconhecida como uma droga bastante eficaz para tratamento de muitas infecções bacterianas humanas. Um outro exemplo de antibiótico eficaz descoberto em fungos foi a griseofulvina.

Actualmente são conhecidas cerca de 70.000 espécies de fungos, duas centenas das quais estão relacionadas com doenças em Humanos. A correcta identificação de fungos importantes na clínica médica é uma actividade de grande relevância nos laboratórios da micologia clínica (Carvalho *et al.* 2007). A identificação do fungo até à espécie é importante para se determinar a etiologia da doença,

novos agentes da doença, para prever a resistência aos agentes antifúngicos e para detectar as causas de infecções nosocomiais entre os doentes hospitalizados (Balajee *et al.* 2007b).

1.1.2 – O género *Aspergillus*

Os fungos do género *Aspergillus* são filamentosos e ubíquos, encontrados em vários substratos e diversas condições ambientais. Estes organismos povoam os mais variados ambientes como o solo, água, plantas e animais, incluindo o Homem (Hohl e Feldmesser 2007; Lopes *et al.* 2004). São também isolados frequentemente a partir de amostras de ar. Algumas espécies são importantes contaminantes alimentares, tolerando temperaturas elevadas e baixas actividades de água. Outras espécies são também importantes de um ponto de vista biotecnológico (Frisvad *et al.* 2007; May e Adams 1997). Por exemplo, *A. niger* é particularmente relevante na produção dos ácidos cítrico e glucónico, ambos importantes para a indústria alimentar.

Algumas espécies de *Aspergillus* são patogénicas oportunistas, sendo capazes de se desenvolver no corpo dos animais e causando uma doença infecciosa designada genericamente de aspergilose. A ubiquidade destes fungos e a facilidade de dispersão dos conídios por eles produzidos, e a reduzida dimensão destes, fazem com que possam permanecer em suspensão no ambiente durante um longo período de tempo, em qualquer estação do ano (Abarca *et al.* 2000; Lai *et al.* 2008; Lazarus *et al.* 2008; Lopes *et al.* 2004). O Homem encontra-se constantemente exposto à inalação destes fungos potencialmente patogénicos, especialmente nos indivíduos imunodeprimidos, sendo frequente o seu isolamento a partir dos mais variados ambientes, incluindo o hospitalar (Lass-Florl *et al.* 1999; Leenders *et al.* 1999). Noutro aspecto relevante para a saúde humana, algumas espécies de *Aspergillus* produzem toxinas, talvez a mais importante destas seja a aflatoxina, carcinogénica, produzida por *A. flavus* ao contaminar frutos secos (Bizzetto *et al.* 1997; Smart *et al.* 1990). Esta espécie de *Aspergillus* pode também ser encontrada no solo e em material orgânico em decomposição. Outras espécies importantes são *A. fumigatus*, encontrada em solo tropical e subtropical e em produtos de plantas como o milho e nozes, *A. niger*, uma espécie cosmopolita, *A.*

parasiticus, patogénica em insectos e saprofítica em plantas, e *A. versicolor*, isolada frequentemente do solo e de alguns alimentos como queijos e algumas carnes curadas (Samson *et al.* 2007b).

Morfologicamente, todas as espécies de *Aspergillus* formam colónias filamentosas. Microscopicamente, estes fungos apresentam hifas hialinas septadas com aproximadamente 2 a 5 μm de diâmetro (Lopes *et al.* 2004). A estrutura de frutificação típica é formada por uma célula-pé, conidióforo, vesícula, métula e/ou fiálide, que promove a reprodução assexuada do fungo através da produção de esporos externos, ou conídios, que têm 2 a 3 μm de diâmetro (Fig. 1.2) (Samson *et al.* 2007a). Algumas espécies apresentam uma forma sexuada, ou teleomórfica, caracterizada pela presença de cleistotécios, ascos e ascósporos. Nestes casos, o teleomorfo é classificado num dos oito géneros *Emericella*, *Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Hemicarpenales*, *Sclerocleista* ou *Fennellia* (Pitt e Samson 2007).

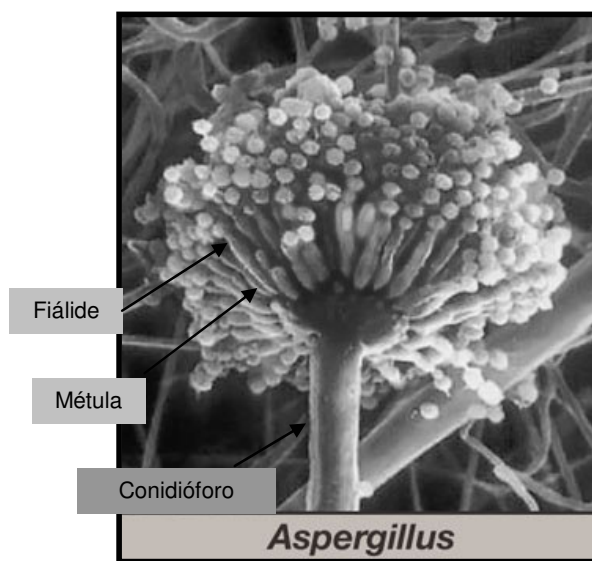


Fig. 1.2. Imagem ilustrativa da estrutura de frutificação típica de *Aspergillus* (micrografia electrónica de *Aspergillus fumigatus*, adaptada de Hickey *et al.* 2005).

1.1.3. Classificação do género *Aspergillus*

A última monografia completa sobre *Aspergillus* foi escrita em 1965, com a descrição de 132 espécies e 18 variedades de *Aspergillus*. Posteriormente foram descritas novas espécies e ocorreram alterações na classificação destes fungos. São actualmente reconhecidas mais de 250 espécies de *Aspergillus*, baseadas principalmente em caracteres fenotípicos, com ênfase para os morfológicos. As espécies de *Aspergillus* são tradicionalmente divididas em seis grandes grupos: *Flavi*, *Fumigati*, *Ornati*, *Clavati*, *Nidulantes* e *Circumdati*, com uma ou mais secções (Richardson e Warnock 2004). A identificação das espécies mais comuns de *Aspergillus* continua, no entanto, a ser problemática devido à grande variabilidade nas características fenotípicas destes fungos (Geiser *et al.* 2007). Reorganizações recentes na nomenclatura dos fungos do género *Aspergillus* envolvem a definição das espécies com base na análise integrada das suas características fenotípicas e moleculares, com especial ênfase para a análise comparativa das sequências nucleotídicas de múltiplos genes (Geiser *et al.* 2007; Giles *et al.* 2003; Klaassen e Oshero 2007).

O rigor e a estabilidade da classificação do género *Aspergillus* é de grande importância clínica e as alterações de nomenclatura destes fungos devem ser acompanhadas e estar facilmente acessíveis (Giles *et al.* 2003; Pitt e Samson 2007). Recentemente decorreu uma conferência internacional, a “International Workshop on *Aspergillus* Systematics in the Genomic Era” (Utrecht, Holanda, Abril de 2007), onde os participantes desenvolveram temas sobre o que é uma espécie de *Aspergillus* e como se delimita uma espécie. As recomendações desta conferência apontaram para a necessidade de comparar as novas espécies com estirpes que estejam proximamente relacionadas entre si, cada nova proposta de espécie deve ser acompanhada de uma descrição detalhada da sua morfologia e fisiologia, e a denominação das novas espécies deve ser adicionada na base de dados MycoBank (www.mycobank.org). Na descrição de novas espécies de *Aspergillus* é também recomendada a análise de várias regiões independentes do genoma, como por exemplo a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) e os genes da β -tubulina, calmodulina, actina e polimerase RNA. As sequências nucleotídicas obtidas devem ser depositadas em bases de dados públicas. Foi também

proposta neste encontro a construção de uma base de dados integrada para a identificação de *Aspergillus*, que deverá incluir informação sobre sequências nucleotídicas, fotografias, locais de pesquisa e a possibilidade de construir árvores filogenéticas (Samson *et al.* 2007c).

1.1.4 – Relevância clínica do género *Aspergillus*

No início do século XIX, o micologista alemão Johann Heinrich Friedrich Link descreveu várias espécies de *Aspergillus*, mas foi apenas em 1856 que outro micologista, Rudolf Virchow, descreveu o primeiro caso de aspergilose pulmonar (Robinson *et al.* 1995). As infecções por *Aspergillus* localizam-se principalmente nos pulmões, mas podem afectar qualquer parte do organismo (Hohl e Feldmesser 2007; Ramos *et al.* 2002). Estes fungos causam doença principalmente em pessoas com o estado imunológico enfraquecido (p.e. com SIDA ou cancro), indivíduos com problemas antigos que lesionaram os pulmões, como tuberculose ou fibrose cística, e pessoas com asma (Hohl e Feldmesser 2007). Um indivíduo saudável não é normalmente infectado por *Aspergillus* (Cano e Soler 2000). As lesões provocadas pela infecção podem ser variadas, desde a irritação crónica dos pulmões em doentes com asma até danos permanentes no tecido pulmonar. Em alguns casos, o fungo pode mesmo disseminar-se sistemicamente a outros órgãos e provocar morte (Hohl e Feldmesser 2007). As aspergiloses são cada vez mais diagnosticadas em todo o mundo, não só devido ao aumento da população susceptível mas também pelas melhorias dos métodos de diagnóstico laboratorial utilizados. É também de realçar que um diagnóstico precoce da infecção e a aplicação de um tratamento correcto permite a recuperação de um grande número de pacientes (Cano e Soler 2000; Lai *et al.* 2008).

Cerca de 30 espécies do género *Aspergillus* são consideradas patogénicas oportunistas, podendo causar aspergilose. *Aspergillus fumigatus* continua a ser a causa mais frequente de aspergilose invasiva, mas outras espécies estão também relacionadas com patologias no Homem, tais como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. ustus* e *A. versicolor* (Cano e Soler 2000; Hinrikson *et al.* 2005a; Lai *et al.* 2008). Têm vindo a ser registados casos de resistência à medicação por parte de

alguns destes fungos, sendo também por este motivo de extrema importância um diagnóstico rápido e fiável das infecções que provocam (Hinrikson *et al.* 2005a; Lai *et al.* 2008).

A infecção pulmonar por *Aspergillus* é secundária à inalação dos respectivos conídios e subsequente germinação nos tecidos, podendo ocorrer numa variedade de formas clínicas, localizadas ou disseminadas (Aspergilose Invasiva), sendo que qualquer órgão ou sistema do corpo humano pode ser afectado por estes fungos (Radford *et al.* 1998). Podem colonizar as cavidades pré-existentes devido a outras patologias, como a tuberculose, sarcoidose, bronquiectasis, pneumoconiose, ou formar entidades clínicas distintas, denominadas aspergilomas. A localização dos aspergilomas pode ser diversa, dependendo do local de nidificação do fungo (p.e. pulmões, rins ou cérebro). Noutra forma, a aspergilose cutânea pode surgir em locais de inserção de cateteres intravenosos ou de outros dispositivos médicos invasivos (Nunley *et al.* 2002; Richardson e Warnock 2004). Também alguns antígenos de *Aspergillus* são alérgenos, podendo iniciar as designadas aspergiloses broncopulmonares alérgicas, principalmente em hospedeiros atópicos e provocando hipersensibilidade dos pulmões (Hohl e Feldmesser 2007; Richardson e Warnock 2004).

Aspergilose broncopulmonar alérgica

A aspergilose broncopulmonar alérgica é uma patologia de hipersensibilidade dos pulmões, mais frequentemente encontrada em doentes atópicos que desenvolvem episódios de obstrução brônquica (asma) e eosinofilia em sangue periférico subsequente à inalação de esporos de *Aspergillus*. A secreção de muco torna-se pronunciada e resulta na formação de massas que obstruem os brônquios. Os sintomas mais frequentes incluem febre, asma não curativa, tosse produtiva, mal-estar e perda de peso (Lazarus *et al.* 2008; Richardson e Warnock 2004). O modo de actuação nesta patologia está direccionado para o tratamento da asma aguda e exacerbada e evitar o último estágio da fibrose (Lazarus *et al.* 2008). O uso de corticosteróides está indicado quando é elevada a concentração de IgE no soro e há um aumento de infiltrados nas radiografias torácicas. A

prednisona é a droga escolhida para o tratamento, uma vez que é eficaz na redução dos sintomas, na diminuição dos infiltrados e na diminuição das culturas de saliva positivas. O papel das drogas antifúngicas no tratamento deste tipo de patologia ainda não está clarificado, mas o itraconazol parece ser útil como agente corticosteróide em diversos estudos não comparativos. Mais recentemente, estudos aleatórios mostram que o itraconazol tem um efeito benéfico (Rai *et al.* 2004; Salez *et al.* 1999).

Aspergilose cutânea

Estão descritas duas formas de aspergilose cutânea por *Aspergillus* em indivíduos imunocomprometidos. Na aspergilose cutânea primária as lesões surgem no local da inserção de cateteres intravenosos, ou perto dos mesmos, em pessoas que tenham estado em contacto com vestuário contaminado ou com talas aplicadas na pele. Na aspergilose cutânea secundária, as lesões podem resultar tanto de uma infecção hematógena extensa dos pulmões, como de uma extensão da infecção subjacente ao tecido para a pele (Richardson e Warnock 2004). Esta forma de aspergilose ocorre em 5% dos pacientes com infecção disseminada. As lesões podem ser simples ou múltiplas e evoluem para úlceras necróticas com bordos distintos e cobertas de escaras pretas. O diagnóstico da maioria das infecções primárias e secundárias por *Aspergillus* requer uma biópsia da lesão cutânea para cultura e histopatologia. Posteriormente, a amostra deve ser reservada para crescimento em cultura e isolamento do fungo. A cultura das pontas de cateteres tem confirmado o diagnóstico feito com a cultura das lesões, mas são relativamente insensíveis para o início do diagnóstico da aspergilose cutânea. O modo de actuação para esta patologia depende da extensão da infecção e do estado do paciente (Burik *et al.* 1998).

Aspergiloma pulmonar e aspergilose semi-invasiva

Um aspergiloma é uma massa densa e amorfa de micélio de *Aspergillus* que por vezes é encontrado nas cavidades pulmonares residuais causadas por uma tuberculose, sarcoidose, bronquiectase ou

pneumocistose (Richardson e Warnock 2004). Os doentes são normalmente assintomáticos, mas podem apresentar tosse crónica, perda de peso e mal-estar. Muitos indivíduos têm episódios intermitentes de pequenos sangramentos. A hemoptise é o sintoma mais comum, ocorrendo em 50 a 80% dos casos. A aspergilose semi-invasiva, ou aspergilose necrosante crónica, caracteriza-se por um processo destrutivo e indolente dos pulmões devido à invasão do tecido por hifas de *Aspergillus*. Existe invasão local do tecido do pulmão e não há necessidade da existência de uma cavidade preexistente no pulmão para o início da doença. Esta patologia afecta com maior frequência os portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC) e em diversas situações clínicas que comprometem a arquitectura pulmonar ou o estado imunológico do indivíduo (Lopes *et al.* 2004; Richardson e Warnock 2004). Não existe um consenso quanto ao tratamento mais correcto para o aspergiloma pulmonar. A cirurgia de remoção da lesão deve ser reservada para indivíduos de alto risco, devido às potenciais complicações, tal como para pessoas com hemoptise grave. Se a intervenção cirúrgica não for indicada, a injeção percutânea ou a instilação endobronquial de anfotericina B pode ajudar. O tratamento de indivíduos assintomáticos e com sangramento médio ou grave ainda é controverso, mas a observação sem intervenção pode ser o melhor modo de actuação (Lopes *et al.* 2004; Robinson *et al.* 1995).

Aspergilose pulmonar invasiva aguda

A Aspergilose pulmonar invasiva aguda ocorre em indivíduos imunocomprometidos e pode ser classificada como localizada ou difusa. A disseminação hematogénea para outros órgãos é uma complicação frequente em doentes com cancro neutropénico e em receptores de transplante. O sistema nervoso central (SNC) é o segundo local de disseminação desta doença em 10 a 20% dos casos. A angio-invasão é um grande marco numa invasão por *Aspergillus*. Seguidamente pode ocorrer trombose, enfarte e necrose do tecido que protege os pulmões. Também pode ocorrer erosão da parede dos vasos, levando a uma hemorragia grave (Richardson e Warnock 2004).

A apresentação clínica da aspergilose pulmonar invasiva é variada e o diagnóstico é difícil. A situação inicial mais comum em pacientes neutropénicos consiste numa febre incessante (acima dos 38°C), sem qualquer sintoma respiratório e que não responde ao tratamento antibacteriano. A tosse não produtiva é outro sintoma muito comum. Inicialmente, o diagnóstico deve incluir uma radiografia ao tórax e cultura de sangue, embora este último seja muito frequentemente negativo em doentes com infecção invasiva por *Aspergillus*. A tomografia axial computadorizada (TAC) mostra lesões nos pulmões de doentes com raio-X sem qualquer tipo de suspeita (Fig. 1.3). Os sinais de infecção difusa por *Aspergillus* são menos evidentes do que na infecção localizada, sendo necessário outro tipo de métodos para confirmar o diagnóstico. Em doentes neutropénicos e receptores de transplante o exame microscópico e a cultura do lavado bronco-alveolar (LBA) são os melhores meios para confirmar o diagnóstico de aspergilose invasiva pulmonar (García-Ruiz *et al.* 2004; Sole e Salavert 2008).

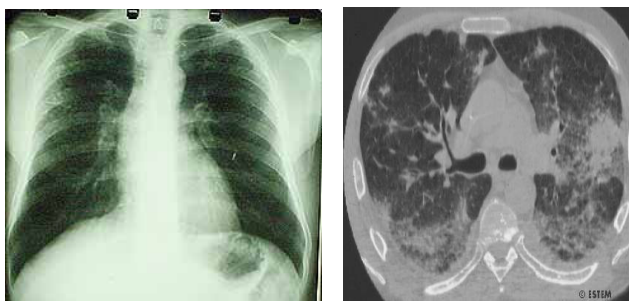


Fig. 1.3. Aspergilose pulmonar em doente transplantado. Observa-se uma maior expressividade radiográfica na TAC (imagem direita) do que na radiografia simples (imagem esquerda) (adaptado de García-Ruiz *et al.* 2004)

O sucesso de tratamento da aspergilose pulmonar invasiva em indivíduos imunocomprometidos depende do início do tratamento antifúngico correcto, na correcção do estado imunológico do indivíduo que é causa da referida infecção, e numa intervenção cirúrgica apropriada. A anfotericina B é o tratamento padrão para aspergilose pulmonar invasiva, particularmente em casos de tratamento para o futuro (toda a vida) e em casos de infecções severas (Lass-Flörl *et al.* 2004; Lopes *et al.* 2004; Richardson e Warnock 2004). Alguns clínicos recomendam a imediata cirurgia para remoção de lesões de *Aspergillus* dos pulmões durante a neutropénia. No entanto, estas

intervenções não estão indicadas em indivíduos com infecção persistente por *Aspergillus*, com hemoptise, ou com uma lesão focal localizada numa zona profunda (por exemplo, perto do mediastino). Este último grupo está em maior risco de morte por perfusão dos brônquios, traqueia ou vasos principais e muitas vezes é essencial uma rápida intervenção cirúrgica (Lopes *et al.* 2004; Wingard *et al.* 2008).

Relação da infecção por *Aspergillus* com a imunodeficiência

A incidência das aspergiloses pulmonares tem aumentado em pacientes imunodeprimidos nas últimas décadas. As razões para esta situação são diversas, nomeadamente a crescente utilização de corticóides e imunossupressores para controlar outras doenças anteriormente fatais, como a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e os pós-transplantes. O indivíduo imunocomprometido fica mais susceptível a diferentes tipos de infecção por *Aspergillus*, incluindo, como já referido anteriormente, aspergilose pulmonar cutânea, aspergilose brônquica obstrutiva, traqueobronquite invasiva, rinossinusite disseminada, aspergilose pulmonar invasiva e semi-invasiva. A aspergilose invasiva é aquela que apresenta uma maior taxa de mortalidade em imunocomprometidos, próxima dos 100% (Gavalda *et al.* 2005; Lopes *et al.* 2004). Os principais factores de risco que predispõem à doença invasiva são neutropénia, terapia com corticóides e imunossupressores, reacção de rejeição do enxerto-hospedeiro por parte do hospedeiro após o transplante de medula óssea, ou após o transplante de órgão sólido, doença por citomegalovírus após transplante, VIH avançada, uso prolongado de antibióticos, história prévia de aspergilose e quimioterapia em pacientes com leucemias com colonização nasal por *Aspergillus*. Embora todas estas doenças sejam de entidades pulmonares distintas, são raras as ocasiões em que uma patologia evolui para outra. Pode acontecer por exemplo com o aspergiloma que, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, pode evoluir para aspergilose pulmonar invasiva (Lopes *et al.* 2004; Richardson e Warnock 2004).

1.1.5 – Antifúngicos

Existem, significativamente, muito menos compostos antifúngicos em comparação com a quantidade de medicamentos antibacterianos disponíveis no mercado apesar do número de drogas antifúngicas ter vindo a crescer nos últimos anos. Existem quatro grandes famílias de compostos com propriedades antifúngicas: os polienos, os azóis, as alilaminas e as equinocandinas. Existe ainda um grupo diversificado de compostos, como a flucitosina e a griseofulvina, que não pertence a nenhuma das grandes famílias. Esta arquitectura não é estática, uma vez que estão sempre a aparecer novos grupos de compostos em desenvolvimento (Richardson e Warnock 2004). Nos últimos anos, a anfotericina B e os azóis, principalmente o cetoconazol, fluconazol e itraconazol, têm sido os fármacos de primeira escolha no tratamento dos doentes. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos (Solé e Salavert 2008; Richardson e Warnock 2004). Os polienos ligam-se aos esteróis da membrana, principalmente ao ergosterol, formando poros ou canais. Alteram a permeabilidade da membrana e permitem o extravasamento de diversas moléculas, levando à morte celular (Bergold e Georgiadis 2004; Lai *et al.* 2008). Ainda não foi estabelecida a duração óptima de um tratamento antifúngico, pois depende da extensão da infecção, da resposta do tratamento e da patologia subjacente do doente. O tratamento deve ser contínuo enquanto o doente estiver imunocomprometido e na maioria dos casos deverá prolongar-se para além do diagnóstico da cura clínica (Richardson e Warnock 2004). As equinocandinas diferem dos outros agentes antifúngicos porque actuam na parede celular dos fungos inibindo a síntese do β -1,3-D-glucano. O papel da equinocandinas no tratamento de aspergilose invasiva ainda não está muito bem estabelecido por estes serem fármacos relativamente recentes. No entanto, as equinocandinas têm sido usadas contra as infecções de *Aspergillus* quando os doentes são intolerantes aos outros antifúngicos, mas a susceptibilidade destes fungos a este fármaco tem-se revelado variável (Bergold e Georgiadis 2004; Diomedi 2004; Lai *et al.* 2008).

1.1.6. Diagnóstico de fungos do género *Aspergillus*

Na maioria dos casos, o diagnóstico de aspergilose é baseado numa combinação de exames clínicos, radiológicos, microbiológicos e histopatológicos (Balajee *et al.* 2007a; Safdar 2007; Richardson e Warnock 2004). Um diagnóstico correcto deve incluir um resultado da cultura positiva para a amostra obtida de forma estéril, ou um exame histopatológico ou citológico da amostra com presença de hifas consistentes de *Aspergillus*. Têm sido desenvolvidos testes serológicos e moleculares baseados na reacção de polimerização em cadeia (PCR) para o diagnóstico da aspergilose invasiva, mas estes métodos ainda estão sob avaliação e o seu uso na rotina ainda não é recomendado (Lopes *et al.* 2004; Richardson e Warnock 2004).

Métodos tradicionais de diagnóstico

Como referido anteriormente, no diagnóstico da aspergilose devem usar-se complementarmente técnicas de imagiologia, histologia e micologia. O método micológico de referência para o diagnóstico permanece a observação directa do fungo nas amostras biológicas e a identificação da espécie após o crescimento em cultura, a partir de biopsia ou aspirado de locais estéreis. A cultura de amostras não estéreis, como a expectoração de doentes imunocomprometidos com evidência clínica de infecção, pode ser usada para suportar o provável diagnóstico de aspergilose invasiva em certos casos. Para assegurar o significado clínico, é necessário que seja demonstrada a presença do fungo num exame microscópico directo da amostra, que este seja também isolado repetidamente do doente e seja feita a correlação com os resultados da histopatologia.

O exame microscópico compreende o exame histopatológico e o exame directo das amostras biológicas. O exame histopatológico de secções de tecido infectado é fiável quando se consegue a visualização de hifas septadas não pigmentadas com ramificações dicotómicas repetidas, característica da infecção por *Aspergillus*. Para tal, é necessário que a colheita se faça exactamente no local da infecção (as infecções fúngicas são muito localizadas) e que se utilizem as colorações adequadas para a observação de fungos. O exame microscópico directo das amostras de saliva ou de

expectoração raramente é útil em doentes com suspeita de aspergilose invasiva, pois os fungos do género *Aspergillus* são ubíquos no ar. No entanto a observação de amostras de LBA, de secreções brônquicas ou de biopsias pode ser muito significativa. As preparações de exame directo devem ser feitas com hidróxido de potássio para que, após a destruição das células do hospedeiro, seja possível a visualização das hifas do fungo. Neste exame devem observar-se as características hifas septadas ramificadas dicotomicamente (Richardson e Warnock 2004). Uma das maiores limitações deste método é a necessidade de serem realizados por técnicos experientes para este tipo de diagnóstico em exames directos, alertados para a real valorização dos elementos fúngicos nas amostras e distinção de resultados falsos negativos ou falsos positivos.

O isolamento do agente etiológico em cultura é essencial para confirmar o diagnóstico (Richardson e Warnock 2004). Uma vez que as espécies de *Aspergillus* se encontram naturalmente no ar, o seu isolamento laboratorial deve ser realizado com cuidados redobrados para evitar a ocorrência de falsos positivos, ou seja, que o seu isolamento seja devido a contaminação ambiental. Muitas vezes, a cultura não é um método muito sensível para o diagnóstico da infecção por *Aspergillus* (Luo e Mitchell 2002). Este fungo é raramente isolado a partir de amostras de sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR) sendo, no entanto, mais comum a obtenção de culturas positivas destas amostras em doentes com endocardites. O isolamento de espécies de *Aspergillus* a partir de amostras de LBA ou de expectoração proveniente de indivíduos imunocomprometidos com um infiltrado pulmonar é normalmente indicativo de infecção. Em indivíduos neutropénicos com cancro e receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas (HSCT) com infecção difusa, a cultura de LBA é positiva em cerca de 60% dos casos. Este sucesso é mais baixo em transplantados de órgãos, com excepção dos receptores de transplante de pulmão. A cultura de LBA não é muito útil em doentes com doença localizada no pulmão. *A. fumigatus* pode ser isolado da amostra de expectoração de doentes com aspergilose broncopulmonar alérgica (Richardson e Warnock 2004). As espécies do género *Aspergillus* são sensíveis à cicloheximida pelo que, quando há suspeita de infecção, não devem ser inoculados em meios com este composto. De resto, estes fungos são pouco

exigentes em termos nutritivos. Como se tratam de fungos filamentosos produtores de grande abundância de esporos, devem-se usar tubos de ensaio em vez de placas para prevenir desidratação do meio e contaminações das culturas e do meio ambiente do laboratório. Crescem rapidamente em qualquer meio de cultura, como por exemplo meio de Sabouraud, mas nem sempre mantêm as características morfológicas macroscópicas de cada espécie. Classicamente o meio de cultura usado para crescimento e identificação diferencial do gênero *Aspergillus* é o meio de agar de Czapek. Macroscopicamente, a superfície das colônias destes fungos apresenta-se no início esbranquiçada e depois assume cores e aspectos muito variáveis dependendo da espécie (Fig. 1.4), que vão desde os tons de amarelo, verde ou castanho claros até verde ou castanho-escuro e preto. A textura é algodoadada, pulverulenta ou aveludada e o reverso das colônias é branco, amarelo, acastanhado ou negro (58).

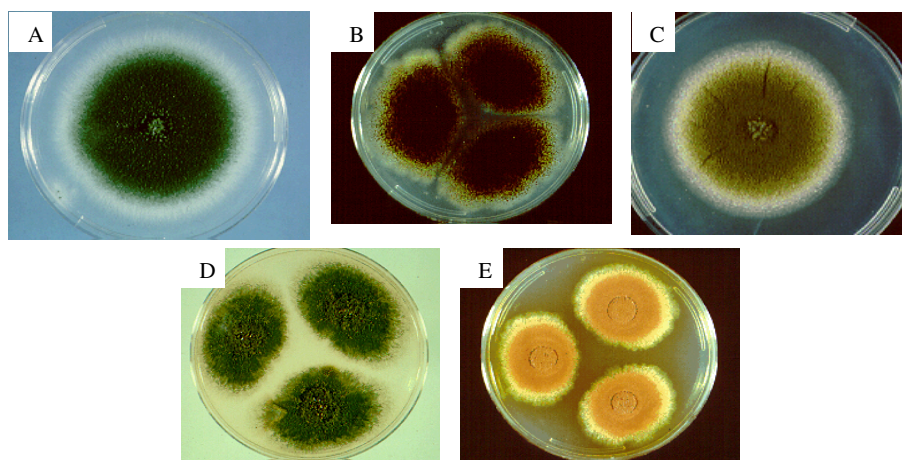


Fig. 1.4. Figuras ilustrativas de culturas de *Aspergillus*: A - *Aspergillus fumigatus*; B - *Aspergillus niger*; C - *Aspergillus flavus*, D - *Aspergillus nidulans*; e E - *Aspergillus terreus*

Microscopicamente, as hifas são septadas e a partir dessa erguem-se conidióforos aéreos, longos, com vesículas terminais sobre as quais numerosas fiálides produzem longas cadeias de conídios aerossolizáveis (Fig. 1.5). A diferenciação das espécies é feita com base na morfologia dos conidióforos e das fiálides (58, 73).

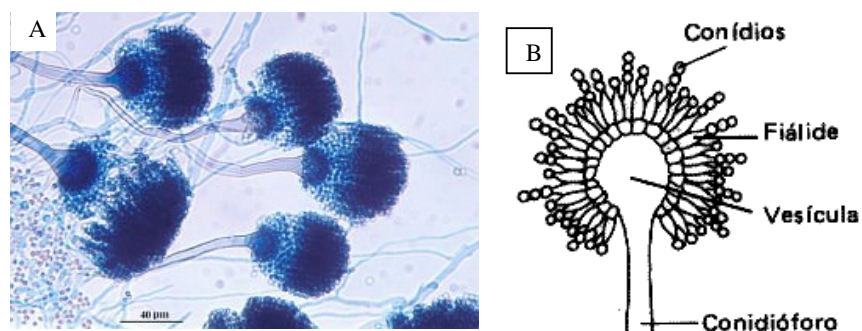


Fig. 1.5. A - Morfologia microscópica de *Aspergillus fumigatus*; B – Esquema ilustrativo das estruturas de *Aspergillus*.

O imunodiagnóstico pode ser também usado na detecção de anticorpos específicos para as espécies de *Aspergillus* recorrendo a técnicas de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), rádioimunoensaio e imunofluorescência indirecta. A detecção de antígenos de *Aspergillus* faz-se também recorrendo a imunoensaios enzimáticos, *immunoblotting* e radioimunoensaios. O método que tem sido mais usado para o diagnóstico de aspergilose invasiva é a detecção por ELISA do galactomanano, um exo-antígeno específico de *Aspergillus*, em LCR, urina ou soro. Estudos recentes sugerem, no entanto, que este ensaio só serve para excluir a doença e não a confirma no caso de dar resultado positivo (Solé e Salavert 2008; Wallace *et al.* 1998). Está disponível um outro ensaio para detectar β -d-glucano, que é um componente da parede celular do fungo, mas a sua utilidade no diagnóstico da aspergilose invasiva ainda não é claro (Kurahde *et al.* 2002).

Métodos moleculares de diagnóstico

Têm sido desenvolvidos inúmeros métodos baseados na reacção de PCR para a detecção e identificação do DNA de *Aspergillus*, nomeadamente a partir da análise directa de amostras clínicas como o sangue, soro e LBA, entre outras (Cruz-Perez *et al.* 2001; Henry *et al.* 2000; Hinrikson *et al.* 2005a; Hinrikson *et al.* 2005b; Khot *et al.* 2008; Loffler *et al.* 1997; Zhao *et al.* 2001). Várias regiões do genoma destes fungos têm sido usadas como alvo para o desenvolvimento desses métodos, com ênfase para os genes que codificam para o RNA ribossomal e respectivos

espaçadores (Richardson e Warnock 2004). A comparação da sequência destes genes é muito usada na chamada taxonomia molecular dos fungos para estabelecer, por exemplo, a sua filogenia. Um dos maiores problemas na aplicação de métodos moleculares para o diagnóstico da aspergilose reside na dificuldade da extracção do DNA genómico a partir das culturas de *Aspergillus* (Griffiths *et al.* 2006; Muller *et al.* 1998; Susuki *et al.* 2006). A presença de uma parede celular complexa e robusta nestes fungos, muito resistente à lise, impede que na extracção de DNA sejam utilizados métodos relativamente simples como os utilizados com a maioria das culturas de bactérias. São utilizados métodos normalmente mais morosos para a extracção de DNA genómico a partir de fungos, nomeadamente de *Aspergillus*, e que dificilmente se adequam para a rotina laboratorial (Muller *et al.* 1998; Jin *et al.* 2004; Fredricks *et al.* 2005; Griffiths *et al.* 2006). Actualmente, o diagnóstico baseado em PCR não é recomendado para o diagnóstico de rotina do laboratório. No entanto, a detecção e identificação molecular de *Aspergillus*, e das suas infecções, é promissora, havendo ainda muito a fazer na optimização e standardização deste tipo de métodos para uma aplicação reprodutível e fácil na rotina clínica.

1.1.7 – Objectivos do estudo e plano da dissertação

Uma eficiente e rápida identificação dos fungos clinicamente relevantes é uma tarefa fundamental no laboratório de micologia clínica. A identificação ao nível da espécie é importante para determinar a etiologia da doença, para detectar novos agentes da doença, para prever as resistências intrínsecas a agentes antifúngicos e para detectar as causas de infecções nosocomiais. A identificação convencional das espécies de *Aspergillus* baseia-se principalmente na análise das suas características fenotípicas, através de procedimentos normalmente morosos e, muitas vezes, ambíguos. O desenvolvimento de novos métodos, mais rápidos e eficientes, para a detecção e identificação de *Aspergillus* constitui assim uma necessidade premente.

O objectivo principal deste trabalho foi o de realizar alguns estudos preliminares no sentido do desenvolvimento de um método de identificação molecular para espécies clinicamente relevantes de

Aspergillus, baseado na reacção de PCR. No Capítulo I desta dissertação é feita uma introdução teórica sobre o tema, focando principalmente em aspectos relacionados com as infecções provocadas por membros do género *Aspergillus* e o estado da arte respeitante ao diagnóstico dessas doenças. No Capítulo II são descritos os procedimentos relacionados com a optimização da extracção de DNA genómico a partir das culturas destes fungos. No Capítulo III são descritos os procedimentos realizados para o desenho de sistemas de *primers* específicos para espécies clinicamente relevantes de *Aspergillus*, nomeadamente para *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. terreus*, baseados na região IST no genoma destes fungos. São também descritas neste capítulo as experiências preliminares realizadas para testar a especificidade dos sistemas de *primers* desenvolvidos. No Capítulo IV são tecidas algumas considerações finais sobre o trabalho desenvolvido.

CAPÍTULO II

Optimização da extracção de DNA genómico a partir de culturas de *Aspergillus*

Capítulo II

2.1. Introdução

As técnicas convencionais de microbiologia são ainda as mais usadas no diagnóstico da aspergilose, incluindo a cultura e a histologia do produto biológico. No entanto, como já referido no Capítulo I, estas técnicas são de sensibilidade limitada e, no caso da cultura, o crescimento do fungo pode levar vários dias. Vários métodos promissores, baseados na análise de ácidos nucleicos, têm sido desenvolvidos para a identificação e detecção directa de fungos em amostras clínicas, incluindo para *Aspergillus* spp. (Fredricks *et al.* 2005; Khot *et al.* 2008). O diagnóstico molecular apresenta certas características, tais como rapidez, sensibilidade, especificidade e facilidade de execução, que são fundamentais nos casos de urgência no diagnóstico. É também de realçar que a maioria dos sistemas moleculares de detecção e identificação de fungos baseia-se na reacção de PCR (Loeffler *et al.* 1999).

No caso específico do desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico para membros do género *Aspergillus*, existe uma dificuldade acrescida relacionada com a muitas vezes deficiente extracção de DNA genómico a partir das células destes fungos (Fredricks *et al.* 2005; Griffiths *et al.* 2006; Karakousis *et al.* 2005; Muller *et al.* 1998). Esta dificuldade, certamente relacionada com uma deficiente lise das suas paredes celulares, torna-se extremamente limitante na optimização deste tipo de metodologias moleculares para o diagnóstico de alguns membros do género *Aspergillus* (Karakousis *et al.* 2005; Latgé 2007). É pois também necessário comparar e desenvolver métodos mais eficazes para a extracção de DNA genómico a partir destes fungos, como parte integrante do desenvolvimento de um método molecular rápido e fiável para o seu diagnóstico.

2.1.1. A parede celular dos fungos do género *Aspergillus*

A parede celular dos fungos é uma estrutura dinâmica e complexa que participa em inúmeros processos importantes. Incluem na sua constituição glicoproteínas e polissacarídeos, essencialmente

glucano e quitina (Beauvais e Latgé 2001; Bowman e Free 2006). Outros componentes existem também em menor quantidade nestas paredes, cuja composição varia entre as espécies de fungos e até entre isolados de uma mesma espécie (Latgé 2007). A estrutura da parede celular está sujeita a alterações, dependendo também das condições e estágio de desenvolvimento a que os fungos estão sujeitos. Esta parede fornece à célula a força mecânica suficiente para aguentar as alterações osmóticas provocadas pelo ambiente, devendo também reter a elasticidade adequada para permitir o crescimento das células, a sua divisão e desenvolvimento. A ruptura da estrutura da parede celular produz um efeito profundo no crescimento e morfologia das células do fungo, muitas vezes tornando-as susceptíveis a lise e morte (Beauvais e Latgé 2001; Bowman e Free 2006; Latgé 2007). Esta parede, devido à sua complexidade, torna-se também uma das principais limitações para uma extracção eficiente dos ácidos nucleicos a partir das células de muitas espécies de fungos.

Os polímeros da parede celular dos fungos são divididos em dois grupos, dependendo da sua solubilidade em meio alcalino quente. Em *Aspergillus fumigatus*, a fracção solúvel é composta por α -(1,3) glucano e galactomanano e a fracção insolúvel, que se pensa estar relacionada com a rigidez da parede, apresenta principalmente quitina, galactomanano e β -(1,3) glucano (Karakousis *et al.* 2005; Latgé 2007). O galactomanano é composto por uma cadeia central de resíduos α -manose com um lado pequeno da cadeia apresentando resíduos β -(1,5) galactofuranose. Com a excepção de *A. fumigatus*, em que representa 10% do β -glucano total, o β 1-3/1-4 glucano nunca foi descrito em nenhum outro fungo como componente da sua parede celular (Hohl e Feldmesser 2007; Latgé 2007). Foi já demonstrada a grande resistência da parede celular destes fungos à lise, verificando-se que mesmo após repetidas extracções com vários detergentes, e incluindo prolongados períodos de fervura, as ligações proteicas não covalentes da parede celular de *A. fumigatus* não eram removidas. Estas ligações foram apenas quebradas após tratamentos enzimáticos com glucanases e/ou quitinases (Latgé 2007).

2.1.2. Métodos usados para a extracção de DNA genómico de *Aspergillus*

Os diferentes métodos descritos na literatura para extracção do DNA de fungos filamentosos são normalmente morosos e complicados devido em grande parte à sua parede celular, que se revela bastante complexa. Os métodos para a extracção de DNA das espécies de *Aspergillus* utilizam normalmente químicos tóxicos, vários passos de congelamento e descongelamento das amostras, que podem mesmo ser levadas a azoto líquido, e passos de agitação com microesferas de vidro, sendo que a maioria dos procedimentos é morosa devido à dificuldade na disrupção das paredes celulares. Por exemplo, o método denominado de “*High-speed cell disruption*” foi testado, em 1998, em algumas leveduras e dois tipos de fungos filamentosos, sendo um deles o *Aspergillus fumigatus* (Muller *et al.* 1998). Este procedimento utiliza reagentes desnaturantes e um método mecânico com microesferas de vidro para lisar as células, o qual se demonstrou eficaz e seguro, tanto para as leveduras como para os fungos filamentosos. Os autores denotaram, no entanto, que estes últimos fungos tinham uma parede celular muito rígida, não se revelando fácil a sua disrupção. Os procedimentos de lise da parede celular através do congelamento e descongelamento das amostras em vários ciclos ou a incubação com detergentes quentes e proteases não são normalmente suficientes para obter DNA de boa qualidade a partir de fungos filamentosos (Fredricks *et al.* 2005). Existem muitos métodos descritos para a extracção de DNA genómico de fungos, incluindo fungos do género *Aspergillus*. A maioria destes métodos utiliza sistemas comerciais disponíveis no mercado, que incluem reagentes próprios e, em alguns casos, são mesmo necessários materiais e equipamentos específicos para a execução desses métodos. Os protocolos existentes são utilizados na extracção de DNA fúngico a partir de uma diversidade de amostras, incluindo amostras biológicas humanas, tecidos vegetais, etc.. Especificamente em relação à extracção de DNA genómico de fungos do género *Aspergillus*, não existe ainda um método eficiente e aplicado universalmente. Aliás, Karakousis *et al.* (2005) mostraram que não existe um método simples, eficiente e universal para lisar as paredes celulares de todos fungos, sendo que os métodos têm de ser muitas vezes optimizados para cada espécie. Cada laboratório acaba por adaptar o melhor

protocolo, dependendo da sua própria rotina e do custo associado ao mesmo. A maioria dos protocolos descritos na literatura acaba também por ser moroso e complexo. Na Tabela 2.1 são comparados vários métodos comerciais de extração de DNA, usados em fungos, com base nos custos, tempo e reagentes adicionais necessários.

Tabela 2.1. Comparação entre métodos comerciais de extração de DNA (adaptado de Fredricks *et al.* 2005)

Método	Tempo de execução	Reagentes e consumíveis adicionais	Equipamento necessário
(MPY) Precipitação das proteínas, purificação do DNA	1h20m	Isopropanol, etanol, tubos de microcentrífuga	Microcentrífuga e placa de aquecimento
(MPPL) Precipitação alcoólica, remoção inibidores do DNA e re-precipitação DNA	1h40m	Isopropanol, etanol, tubos de microcentrífuga	Microcentrífuga e placa de aquecimento
(SM) Lise com solução quente com detergente, precipitação das proteínas, eliminação de inibidores de PCR, precipitação alcoólica para purificação DNA	1h55m	Tubos de microcentrífuga	Microcentrífuga e placa de aquecimento
(UCS) Lise mecânica com microesferas de vidro, adsorção e lavagem do DNA em filtro	2h40m	Nenhum	Microcentrífuga e adaptador de vortex
(FDNA) Lise mecânica com microesferas de vidro por agitação em equipamento próprio (FastPrep), adsorção e lavagem do DNA em coluna	1h15m	Nenhum	Microcentrífuga e máquina FastPrep
(YL-GNOME) Lise enzimática, precipitação e purificação do DNA	4h00m	Isopropanol, tubos de microcentrífuga	Microcentrífuga e placa de aquecimento

A performance destes métodos comerciais na extração de DNA de fungos foi estudada por Fredricks *et al.* (2005). Os métodos MPPL (*MAsterPure plant leaf DNA purification*” - Epicenter, Madison, WI), SM (*SoilMaster DNA extraction* - Epicenter, Madison, WI) e YL-GNOME (*Yeast cell lysis preparatin plus GNOME* - Qbiogene, Irvine, CA) mostraram-se deficientes na extração

de DNA a partir de hifas de *Aspergillus*. Já os métodos UCS (*UltraClean DNA isolation* - MoBio, Inc, Solana Beach, CA) e FDNA (FastDNA - Qbiogene, Irvine, CA) mostraram-se mais adequados para a extracção de DNA a partir destes fungos, usando uma agitação da amostra com microsferas para romper a parede celular. Estes dois últimos sistemas têm custos muito próximos e intermédios em relação aos outros métodos. Anteriormente, já Muller *et al.* (1998) tinham demonstrado que o método FDNA parecia funcionar bem com *Aspergillus fumigatus* e outras espécies de fungos importantes na clínica médica.

Os métodos físicos, químicos e enzimáticos para uma lise eficiente da parede celular de fungos podem ser uma alternativa aos sistemas comerciais, com custos mais baixos mas requerendo normalmente um pouco mais de tempo. A comparação de cada um destes métodos indica que com os agentes químicos, como o HCl e o NaOH, não se obtém lise celular para o género *Aspergillus*. A digestão enzimática (p.e. com proteinase K ou liticase) funciona apenas em 10% das amostras deste fungo e a disrupção física das células pode ser útil em cerca de 50 a 100% das amostras, dependendo do método utilizado. Pode-se ainda obter uma média de 95% de amostras com a parede celular lisada com o método físico de esmagamento com um pilão e um morteiro (Karakousis *et al.* 2005).

Na selecção de um método para a extracção de DNA fúngico, para além do rendimento, há também de ter em conta a qualidade e pureza do DNA obtido. Diversos contaminantes inibitórios, como as nucleases, os polissacáridos e os pigmentos, se não forem removidos na extracção, podem reduzir significativamente a sensibilidade da reacção de PCR. Outro factor importante na optimização deste tipo de métodos é o cuidado no manuseamento das amostras e materiais durante a extracção de DNA de modo a evitar contaminações de origem ambiental. Os fungos do género *Aspergillus*, entre outros, são ubíquos no ambiente, sendo muitas vezes uma causa importante de contaminação e de resultados falsos positivos nas reacções de PCR (Karakousis *et al.* 2005; Loeffler *et al.* 1999).

2.1.3. Objectivo do trabalho deste capítulo

Neste Capítulo são descritos os procedimentos realizados para a optimização de um método de extracção de DNA genómico a partir de culturas de espécies de *Aspergillus*, adaptável à rotina de um laboratório de micologia clínica. O principal objectivo foi conseguir otimizar um método mais eficaz para a lise da parede celular desses fungos, que fosse pouco dispendioso, eficaz e útil para a rotina do laboratório.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Estirpes utilizadas

Foram utilizadas neste trabalho estirpes de espécies clinicamente relevantes, representativas do género *Aspergillus* e previamente identificadas por métodos convencionais. Todas as estirpes são mantidas no Laboratório de Micologia do Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Estas estirpes são mantidas a – 70 °C em meio de Sabouraud com 30% de glicerol. Para a obtenção de culturas frescas, foram primeiramente inoculadas em placas com meio de Sabouraud duas a três ansadas de micélio a partir das culturas congeladas. As placas foram incubadas durante 72 h à temperatura ambiente. Seguidamente, três a quatro colónias entretanto formadas foram transferidas para tubos de ensaio com meio de cultura líquido de extracto de levedura (YM), utilizando um bisturi e pinça esterilizadas e evitando levar meio de cultura sólido juntamente com as colónias. As culturas foram incubadas durante mais 72 h, com agitação orbital (200 rpm) e sem a presença de luz. Na Tabela 2.2 encontram-se indicadas as estirpes e espécies usadas neste trabalho.

Tabela 2.2. Estirpes e espécies de *Aspergillus* utilizadas neste trabalho

Espécie	Estirpe	Origem
<i>Aspergillus terreus</i>	2283	Secreções brônquicas (Instituto Português de Oncologia)
	10283	Sangue (Hospital de Santa Maria)
	11283	Expectoração (Instituto Português de Oncologia)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5283	Urina (Hospital de Santa Maria)
	7283	Lavado bronco-alveolar (Hospital de Santa Maria)
	8283	Lavado bronco-alveolar (Instituto Português de Oncologia)
<i>Aspergillus niger</i>	6283	Secreções brônquicas (Hospital S. Jorge)
	12283	Lavado bronco-alveolar (Instituto Português de Oncologia)
<i>Aspergillus flavus</i>	3283	Lavado bronco-alveolar (Hospital Santa Maria)
<i>Aspergillus nidulans</i>	4283	Expectoração (Instituto Português de Oncologia)
	9283	Secreções brônquicas (Hospital Egas Moniz)
<i>Aspergillus versicolor</i>	1283	Lavado bronco-alveolar (Instituto Português de Oncologia)
<i>Aspergillus</i> sp.	13283	Urina (Hospital Santa Maria)

2.2.2. Métodos de extracção de DNA genómico

Método TL

No método TL prepararam-se tubos “Eppendorf” a que foram adicionados um volume equivalente a 200 µl de esferas de vidro (\varnothing 0,4 – 0,6 mm) e 500 µl de Tampão de Lise 1 (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,3% (p/v), pH 8). Dois a três aglomerados de micélio crescidos em meio de cultura líquida foram retirados para uma placa de Petri esterilizada, comprimindo-os previamente contra as paredes do tubo de ensaio a fim de trazer a menor quantidade possível de meio de cultura. Com o auxílio de uma pinça e bisturi esterilizados à chama, os aglomerados de micélio foram lavados duas a três vezes em água destilada esterilizada para retirar todo o meio de cultura. Em seguida, o excesso de água foi removido dos aglomerados de micélio, comprimindo-os contra o vidro da caixa de Petri. Foram depois colocados nos tubos Eppendorf com esferas de vidro e Tampão de Lise 1 e a suspensão resultante foi agitada fortemente no Vortex durante 15 minutos. Seguiu-se um passo de incubação em banho de água a 65 °C durante uma hora, após o que a suspensão foi novamente agitada no Vortex durante 15 minutos e centrifugada durante mais 15 minutos a 11.000 g. O sobrenadante, que contém o DNA extraído, foi depois retirado para um novo tubo Eppendorf ao qual se adicionou 10 µl de Proteinase K (0,5 mg/ml). Após uma incubação a 60 °C durante 60 minutos, a solução de DNA extraído foi mantida a – 20 °C até utilização.

Método TL modificado

O método TL modificado segue o mesmo procedimento do método TL, descrito atrás, mas com algumas modificações. O passo de lavagem do micélio foi reforçado para ter a certeza que os inibidores da reacção de PCR eram removidos, aumentando para quatro as lavagens do micélio. Por outro lado, os tempos de agitação em vortex da mistura do micélio com as esferas de vidro e o tampão de lise foram aumentados de 15 para 30 minutos, para tentar uma melhor ruptura da parede celular dos fungos.

Método TE fenol

No método TE fenol foram também retirados e lavados dois a três aglomerados de micélio a partir da cultura líquida de meio YM, como descrito anteriormente. O micélio foi primeiramente suspenso em 1,5 ml de água bidestilada esterilizada, num tubo Eppendorf de 2 ml, a que foram adicionados previamente cerca de 200 µl de microsferas de vidro. A suspensão de micélio foi centrifugada a 13.000 rpm durante 4 minutos, após o que se descartou o sobrenadante. O sedimento foi depois congelado a – 20 °C durante 1 hora, após o que se adicionou 250 µl de Tampão TE Fenol (retirado do frasco de fenol, o tampão está por cima do fenol, na fase superior) pH 8, 250 µl de clorofórmio e 500 µl de tampão de lise 1. A mistura foi agitada durante 20 minutos no vortex e seguidamente centrifugada durante 30 minutos a 13.000 rpm. De seguida, 400 µl do sobrenadante anterior foram adicionados a 1 ml de etanol absoluto num tubo Eppendorf de 1,5 ml e deixados a – 20 °C durante 45 minutos. Os tubos foram em seguida centrifugados durante 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi removido e deixou-se secar o sedimento à temperatura ambiente de modo a remover o etanol em excesso (este procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar, mas sem deixar secar demasiado o sedimento). Finalmente, o sedimento foi dissolvido em 30 µl de tampão TE (0,1M Tris; 0,1M EDTA, pH 8) a 55 °C durante 15 minutos.

Método AZ

No método AZ, para a extracção de DNA, dois a três aglomerados de micélio foram lavados como descrito anteriormente e colocados em tubos Eppendorf de 1,5 ml a que foram previamente adicionadas esferas de vidro numa quantidade equivalente a 200 µl. Os tubos Eppendorf foram seguidamente imersos em azoto líquido durante 5 minutos, de modo a rebentar a parede celular dos fungos, e transferidos depois para gelo. Em seguida, foram adicionados 250 µl de fenol, 250 µl de clorofórmio e 500 µl de tampão de lise 2 (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS, 1% w/v PVPP). O PVPP foi adicionado ao tampão de lise 2 imediatamente antes de ser usado, de modo a eliminar potenciais inibidores polifenólicos da reacção

de PCR. Os tubos foram agitados no vortex durante 20 minutos na rotação máxima e centrifugados a 14.500 rpm durante 25 minutos a 4 °C. A fase aquosa do sobrenadante foi transferida para um novo tubo Eppendorf de 1,5 ml, ao qual se adicionou igual volume de isopropanol frio e se agitou por inversão suave. O isopropanol permite uma maior co-precipitação de sais que o etanol absoluto, permitindo ainda uma maior precipitação do DNA. Os tubos foram depois centrifugados a 14.500 rpm durante 10 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com 1 ml de etanol a 70% frio, seguindo-se uma nova centrifugação a 14.500 rpm durante 5 minutos a 4 °C (o etanol elimina o excesso de sais). O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco com o tubo aberto e invertido, à temperatura ambiente, durante 5 a 10 minutos (tendo o cuidado para não deixar secar demais). O sedimento foi depois dissolvido em 50 µl de tampão TE + RNase A (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA dissódico pH 8,50 µl.ml⁻¹ RNase A), incubando os tubos durante 15 minutos a 55 °C, agitando ocasionalmente. A solução de DNA assim obtida foi depois mantida a – 20 °C até utilização.

2.2.3. Avaliação da eficiência dos métodos de extracção de DNA

A avaliação da eficiência da extracção de DNA foi efectuada correndo uma alíquota da solução de DNA extraído numa electroforese em gel de agarose. Foi realizada uma electroforese em gel de agarose a 2% em 100 ml de tampão TBE 0,5x, ao qual foram adicionados 2 µl de brometo de etídio (2mg/ml). O marcador de pesos moleculares utilizado foi o Molecular Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Para a electroforese foram adicionados 2 µl da solução de aplicação corada a 7 µl da solução de DNA. A electroforese decorreu a 100V durante 40 minutos. As bandas foram visualizadas num transiluminador (UVitec, Reino Unido) de luz ultravioleta e as imagens captadas com um sistema de aquisição de imagem digital (MITSUBISHI P93).

Adicionalmente, em todos os protocolos testados neste trabalho confirmou-se a existência ou inexistência de DNA extraído da amostra através de uma reacção de PCR com os *primers* universais para fungos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4

(TCCTCCGCTTATTGATATGC), com o seguinte programa: passo inicial de desnaturação a 95°C durante 5 minutos; 94°C durante 45 segundos, 54°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minutos, com 40 ciclos; e um passo final de extensão a 72°C durante 5 minutos. A mistura reaccional continha 23,8 µl de água bidestilada estéril (Braun), 5,0 µl de tampão 10x, 6,0 µl de MgCl₂ 25 mM, 8,0 µl de dNTPs 1,25 mM, 3,0 µl de cada *primer* universal [5 µM], 0,2 µl de Taq 1U e 1 µl de DNA de cada amostra.

2.3. Resultados e Discussão

Os métodos descritos para a extracção de DNA de fungos filamentosos do género *Aspergillus* são inúmeros. Estes fungos representam uma dificuldade acrescida para a extracção de DNA devido à rígida parede celular que possuem, que é bastante difícil de lisar. Foram testados diferentes métodos, e variações desses métodos, para encontrar aquele que fosse mais adequado e eficiente para as nossas condições experimentais. O primeiro método a ser testado foi o método TL, um processo que utiliza uma lise mecânica com microesferas de vidro associada à incubação da amostra a elevadas temperaturas. No entanto, este método revelou-se bastante deficiente na recuperação de ácidos nucleicos a partir das várias espécies de *Aspergillus* testadas, não se visualizando quaisquer indícios de DNA extraído após a realização de electroforese em gel de agarose com alíquotas da solução resultante da extracção. Numa tentativa de melhorar a eficiência da extracção, foi testado em seguida o método TL modificado, em que foram aumentados o número de lavagens do micélio e o tempo de incubação em que decorreu a lise celular. Este método TL modificado, no entanto, também não foi totalmente eficaz. Aquando da utilização das respectivas soluções de DNA extraído em reacções de PCR, usando *primers* universais para fungos, apenas se registou amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes para as espécies *A. nidulans* (estirpe nº. 4283) e *A. fumigatus* (estirpe nº. 7283) (Fig. 2.1.). A utilização de diferentes diluições das soluções de DNA extraído (1:750; 1:500 e 1:200) na mistura reaccional de PCR não melhoraram os resultados obtidos nas amplificações. Assim, este método revelou-se também pouco eficaz para a extracção de DNA a

partir de todas as espécies de *Aspergillus* testadas, apesar de ter funcionado bem para algumas estirpes.

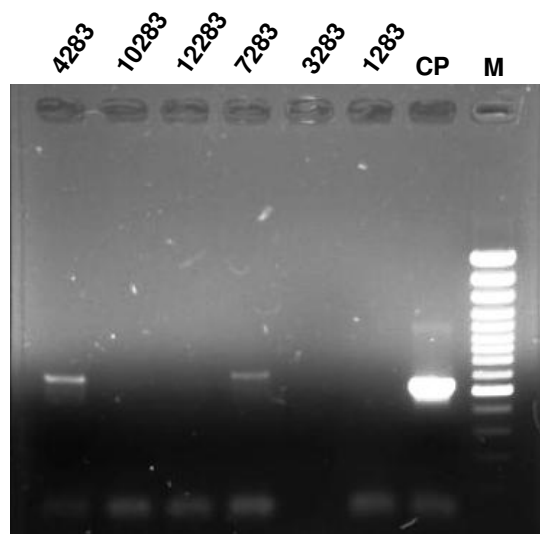


Fig. 2.1. Ilustração dos resultados obtidos em reacções de PCR com os *primers* universais para fungos ITS1 e ITS4, usando como DNA molde as soluções extraídas com o método TL modificado. As estirpes usadas nesta experiência foram: 4283 (*A. nidulans*); 10283 (*A. terreus*); 12283 (*A. niger*); 7283 (*A. fumigatus*); 3283 (*A. flavus*); e 1283 (*A. versicolor*). M - marcador de pesos moleculares de 100 pb (GeneRuler™). CP - controlo positivo da reacção de PCR com DNA extraído de *Candida albicans*.

O terceiro método testado para a extracção de DNA foi designado de TE fenol. Este método associa uma lise mecânica com microesferas de vidro, a utilização de agentes químicos para a lise e o congelamento/descongelamento das amostras. Este método de extracção revelou-se eficaz para a extracção de DNA apenas para algumas das espécies de *Aspergillus*, nomeadamente para *A. nidulans* e *A. flavus* (Fig. 2.2). A extracção de DNA a partir de *A. niger* mostrou-se pouco reprodutível e eficiente. Não foi detectado qualquer DNA extraído para as restantes espécies de *Aspergillus* testadas.

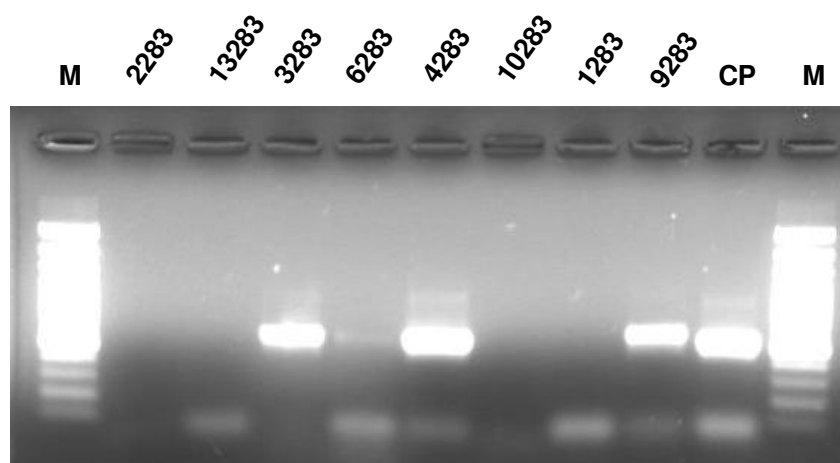


Fig. 2.2. Ilustração dos resultados obtidos em reacções de PCR com os *primers* universais para fungos ITS1 e ITS4, usando como DNA molde as soluções extraídas com o método TE fenol. As estirpes usadas nesta experiência foram: 2283 (*A. terreus*); 13283 (*Aspergillus* sp.); 3283 (*A. flavus*); 6283 (*A. niger*); 4283 (*A. nidulans*); 10283 (*A. terreus*); 1283 (*A. versicolor*); e 9283 (*A. nidulans*). M - marcador de pesos moleculares de 100 pb (GeneRuler™). CP - controlo positivo da reacção de PCR com DNA extraído de *Candida albicans*.

Para tentar melhorar a eficiência da extracção de DNA, o método AZ foi também testado. Este método inclui um passo de lise em que as amostras são congeladas em azoto líquido, associado também a uma disrupção mecânica das células, lise química e centrifugação das amostras a 4°C. O método AZ revelou-se, assim, o mais eficaz para a extracção de DNA a partir de todas as espécies de *Aspergillus* utilizadas (Fig. 2.3).

Todos os métodos de extracção de DNA testados neste trabalho são relativamente económicos, mas apresentam tempos experimentais associados diferentes (Fig. 2.4). O método AZ não só se revelou o mais eficiente para a extracção de DNA a partir de todas as espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes testadas, como também é o de execução mais rápida.

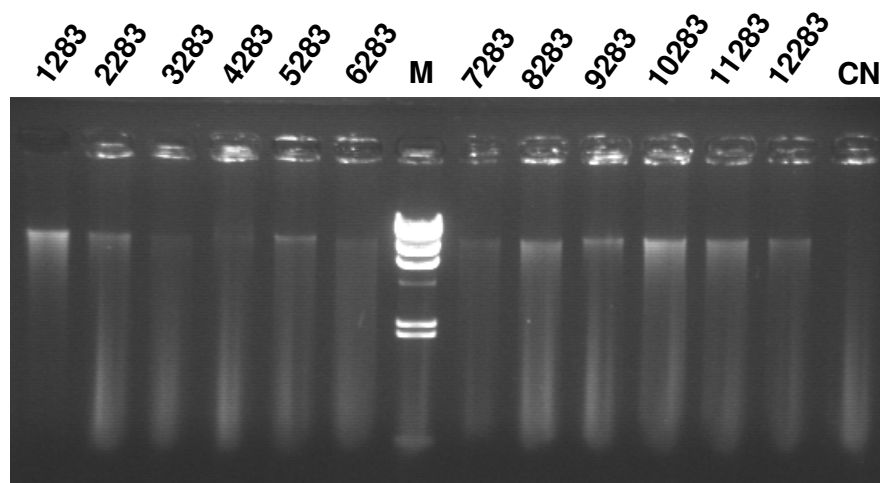


Fig. 2.3. Ilustração das bandas de DNA de elevado peso molecular, correspondentes ao DNA genómico extraído com o método AZ, após migração num gel de electroforese: 1283 (*A. versicolor*); 2283 (*A. terreus*); 3283 (*A. flavus*); 4283 (*A. nidulans*); 5283 (*A. fumigatus*); 6283 (*A. niger*); 7283 e 8283 (*A. fumigatus*); 9283 (*A. nidulans*); 10283 e 11283 (*A. terreus*); e 12283 (*A. niger*); CN - controlo negativo; M – marcador de pesos moleculares (GeneRuler™)

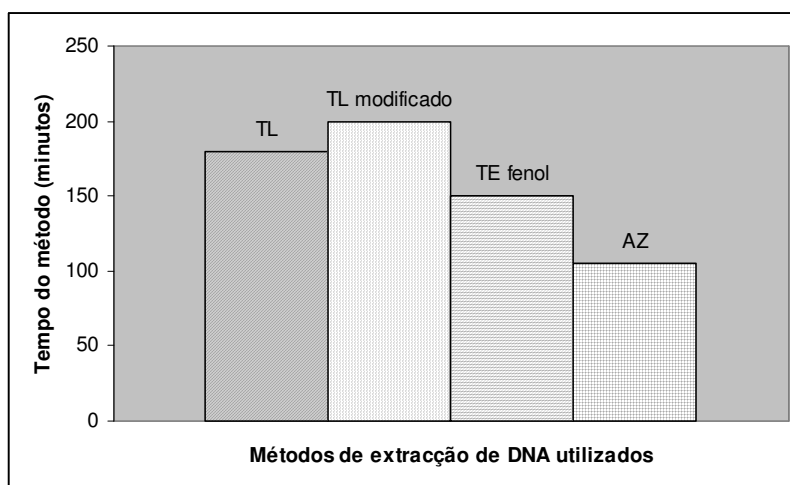


Fig. 2.4. Comparação dos tempos experimentais para a execução de cada um dos quatro métodos de extracção de DNA testados neste trabalho.

A estrutura da parede celular dos fungos é altamente complexa quando comparada com as membranas celulares dos mamíferos e com as paredes celulares das bactérias. As membranas celulares consistem numa dupla camada lipídica contendo proteínas transmembranares, sendo relativamente fáceis de lisar quando tratadas com enzimas proteolíticas, como por exemplo a proteinase K, e detergentes. Em contraste, as paredes celulares dos fungos consistem em camadas grossas de quitina, polímeros de β -glucano, lípidos e péptidos, bastante resistentes à digestão enzimática e à lise química, dificultando o desenvolvimento de um único método universal para a extracção de DNA genómico a partir destes organismos (Karakousis *et al.* 2005). O método de extracção de DNA para *Aspergillus* que se revelou mais eficiente, optimizado neste trabalho, foi o método AZ. Este método conjuga a utilização de reagentes químicos, como o clorofórmio e o fenol, a disrupção mecânica com esferas de vidro e o congelamento em azoto líquido para lisar as células dos fungos.

Como demonstrado pelos maus resultados obtidos pelos métodos TL e TL modificado, a simples disrupção mecânica com esferas de vidro e a incubação das amostras a uma temperatura elevada não parecem procedimentos suficientemente vigorosos para rebentar a parede celular de todas as espécies de *Aspergillus*. No método TE fenol foram utilizados reagentes químicos para a lise celular, juntamente com um passo de congelação e descongelação das amostras para destruir a parede celular das espécies de *Aspergillus*. Os resultados da extracção, apesar de melhores que nos métodos TL e TL modificado, não foram ainda assim satisfatórios para todas as espécies de *Aspergillus* testadas. Fredricks *et al.* (2005) mostraram também no seu estudo que o sucessivo congelamento e descongelamento das amostras não é suficiente para quebrar a parede celular dos fungos filamentosos.

O método AZ revela-se assim o mais eficiente, pouco dispendioso e fácil de executar, sendo passível de ser usado na rotina em laboratórios de análises micológicas. Este método inclui, entre outros, um passo de congelamento das amostras em azoto líquido, sendo que outros autores demonstraram já a utilidade deste tipo de procedimento para lisar as células fúngicas (Löffler *et al.*

1997). São poucos os estudos experimentais disponíveis que focam na optimização dos procedimentos para a extracção de DNA a partir de fungos do género *Aspergillus*. Neste trabalho foi optimizada uma técnica eficiente, económica e simples para a extracção de DNA destas espécies.

CAPÍTULO III

Identificação molecular de espécies clinicamente relevantes de *Aspergillus*

Capítulo III

3.1. Introdução

3.1.1. Identificação molecular de fungos do género *Aspergillus*

Várias espécies de *Aspergillus* são frequentemente implicadas em casos de infecção invasiva, com especial incidência em indivíduos imunodeprimidos. As principais espécies responsáveis por este tipo de micoses são *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*. No entanto, outras espécies como por exemplo *A. terreus*, *A. nidulans* e *A. ochraceus* são também frequentemente associadas a casos de infecção. Destas espécies, *A. terreus* tem levantado especial preocupação devido à elevada taxa de mortalidade das infecções que provoca e à sua resistência a antibióticos como a anfotericina B.

O diagnóstico da Aspergilose pode revelar-se complexo, requerendo a análise de dados clínicos, radiológicos, microbiológicos e, por vezes, serológicos. No entanto, a generalidade dos métodos convencionais de diagnóstico de Aspergilose são demorados, pouco sensíveis e, muitas vezes, originam resultados ambíguos e de difícil interpretação (Cano e Soler 2000). Estudos anteriores têm mostrado a grande importância de um diagnóstico clínico rápido da Aspergilose de modo a poder ser feita uma correcta terapêutica no doente infectado (Burik *et al.* 1998; Rai *et al.* 2004; Salez *et al.* 1999; Solé *et al.* 2005). A correcta identificação da espécie de *Aspergillus* responsável pela infecção assume aqui particular importância.

Têm sido descritas várias aplicações para o diagnóstico molecular de Aspergilose e para a identificação dos respectivos agentes etiológicos, nomeadamente para a identificação directa das espécies fúngicas a partir de colónias purificadas, micélio ou de amostras biológicas do paciente. A análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacer 1 – 5.8S - Internal Transcribed Spacer 2*), no genoma destes fungos, é bastante utilizada para a identificação devido às diferenças nucleotídicas existentes entre as várias espécies de *Aspergillus*. Esta região permite, assim, o desenho de *primers* específicos para cada espécie, utilizados por exemplo em reacções de PCR. Noutro exemplo, Henry *et al.* (2000) utilizaram a análise da sequência da região ITS para a identificação de *A. fumigatus*, *A.*

terreus, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. ustus* a partir de doentes com aspergilose invasiva. A região ITS foi assim amplificada e sequenciada. A sequência foi comparada com outras sequências de espécies referenciadas em bases de dados públicas (GenBank). Hinrikson *et al.* (2005b) avaliaram as regiões D1 e D2 da subunidade maior do RNA ribossómico e a região ITS para a identificação de 13 espécies de *Aspergillus* relevantes a nível clínico, incluindo *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. versicolor*. Os autores concluíram que as sequências nucleotídicas disponíveis nas bases de dados públicas, como o GenBank, ainda são incompletas e, algumas, apresentam uma qualidade bastante duvidosa. No entanto, verificaram também que a região ITS era a mais adequada para a discriminação entre as espécies de *Aspergillus*.

Alguns estudos têm descrito técnicas de PCR-*multiplex* para a diferenciação entre várias espécies microbianas numa mesma reacção, incluindo espécies de *Aspergillus*. Por exemplo, Luo e Mitchell (2002) aplicaram esta tecnologia para identificação de múltiplas espécies patogénicas de fungos. Estes autores desenharam cinco *primers* específicos com alvos complementares na região ITS de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e de *A. fumigatus*. Quando aplicados num sistema envolvendo duas reacções de PCR-*multiplex*, os autores mostraram ser possível a identificação das várias espécies fúngicas com estes *primers*, a partir de DNA extraído ou directamente a partir das colónias dos fungos. O sistema apresentou uma especificidade e sensibilidade de 100%, revelando-se uma alternativa rápida e fiável para a identificação de espécies de fungos clinicamente relevantes (Luo e Mitchell 2002). Noutro exemplo, apesar de não ser propriamente um PCR-*multiplex*, Zhao *et al.* (2001) desenharam um par de *primers* específicos para *A. fumigatus*, baseados também na região ITS. A especificidade e a sensibilidade dos *primers* foram avaliadas usando 24 isolados de *A. fumigatus* e variantes e 41 isolados de outras espécies de *Aspergillus*, *Candida* e espécies de bactérias. O método desenvolvido mostrou-se específico e com um elevado nível de sensibilidade na identificação da espécie *A. fumigatus* e de outras espécies próximas. Num exemplo mais recente, Logotheti *et al.* (2008) desenvolveram um sistema de PCR-*multiplex* para a discriminação entre as espécies *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus*. Neste

estudo, no entanto, com a exceção de *A. terreus*, foram usadas outras regiões do genoma que não a região ITS para o desenho dos *primers* específicos, nomeadamente os genes da *aspergillopepsin*.

3.1.2. Objectivos dos trabalhos deste capítulo

No Capítulo III desta dissertação são descritos os trabalhos realizados no sentido do desenvolvimento de um sistema de identificação molecular para as espécies clinicamente relevantes de *Aspergillus*. Em primeiro lugar, foi realizado um estudo do estado da arte para seleccionar as espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes. Em segundo lugar, as sequências nucleotídicas da região ITS dessas e de outras espécies de fungos foram recolhidas a partir de bases de dados públicas. Em terceiro lugar, foi realizada uma análise comparativa das sequências de DNA com vista à selecção de segmentos específicos para cada espécie de *Aspergillus* clinicamente relevante. Em quarto lugar, foram desenhados sistemas de *primers*, com base nos segmentos encontrados, que permitissem discriminar entre as espécies de *Aspergillus* seleccionadas. Em quinto e último lugar, foram realizadas experiências de PCR, baseadas nos sistemas de *primers* desenhados, para a identificação das espécies de *Aspergillus*. Estas experiências preliminares constituem uma base para o desenvolvimento de um sistema de PCR-*multiplex* para a identificação de espécies clinicamente relevantes de *Aspergillus*.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Selecção das espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes

Foi decidido otimizar um sistema de identificação molecular para espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes, nomeadamente responsáveis por casos de aspergilose invasiva. Neste sentido, foi feito um levantamento das principais espécies através de uma pesquisa na literatura da especialidade, nomeadamente já referenciada no Capítulo I desta dissertação. Com base na informação recolhida, foram seleccionadas para o estudo as seguintes espécies: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. terreus*.

3.2.2. Desenho de *primers* específicos

Foi desenvolvido anteriormente um conjunto de programas informáticos, designado YEAST 3000, para o desenho integrado de sondas e *primers* específicos de DNA (Inácio 2003). Estas ferramentas, desenvolvidas para o ambiente Windows e em constante actualização, cobrem todo o processo do desenho de sondas, desde a pesquisa e recolha de sequências de DNA a partir de bases de dados públicas (SEQUENCE SEARCH ENGINE), a selecção de segmentos específicos (PROBE DESIGN) e o teste da especificidade *in silico* das regiões-alvo seleccionadas (PROBE MATCH). Com base nestes programas informáticos, foram recolhidas centenas de sequências da região ITS de *Aspergillus* spp. disponíveis a partir da base de dados pública GenBank. Em seguida, foi realizada uma análise comparativa dessas sequências e seleccionados segmentos específicos para cada espécie de *Aspergillus* clinicamente relevante, anteriormente seleccionadas. Foram em seguida desenhados *primers* específicos para cada espécie, com base nas regiões encontradas. Cada um destes *primers* específicos, em conjunto com um dos *primers* universais ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ou ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), deveria permitir a amplificação específica de um fragmento de DNA a partir de cada uma das espécies *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. terreus*.

3.2.3. Espécies e estirpes utilizadas neste trabalho

As espécies e estirpes de *Aspergillus* utilizadas neste trabalho foram as que estão referenciadas na Tabela 2.2 do Capítulo II.

3.2.4. Extracção de DNA

Para a extracção de DNA a partir das culturas de *Aspergillus* foi utilizado o Protocolo AZ descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo II.

3.2.5. Reacções de PCR

Cada par de *primers* [*primer* específico + *primer* universal (ITS1 ou ITS4)] foi testado em reacções de PCR simples. Utilizaram-se para estes ensaios misturas reaccionais que continham 1,8 µl de MgCl₂ [25 mM], 2,4 µl de dNTPs [1,25 mM cada], 0,9 µl de cada *primer* [5 µM], 0,12 µl de polimerase (Taq, 1U) e 1,5 µl do respectivo tampão 10×, e 7,34 µl de solução diluída (1:50) de DNA extraído. Para controlo negativo adicionou-se água destilada na mistura reaccional em substituição da solução de DNA. O programa de PCR utilizado foi iniciado com um período de 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos consistindo em 94 °C durante 45 segundos, 54 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 1 minuto. O último passo do programa consistiu numa extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados através de uma electroforese em gel de agarose, tal como está descrito nos Materiais e Métodos do Capítulo II.

3.3. Resultados e Discussão

A sistemática de fungos do género *Aspergillus* baseia-se principalmente em características morfológicas, por vezes ambíguas, levando a que muitas espécies pareçam ser, de facto, complexos de espécies quando analisadas com base em métodos moleculares. Por exemplo, estirpes classificadas por métodos tradicionais como *A. flavus*, *A. oryzae* e *A. parasiticus* aparecem muito próximas entre si, em agrupamentos polifiléticos, quando analisadas filogeneticamente com base nas suas sequências do rDNA. Neste contexto, foi impossível desenhar *primers* completamente específicos para todas as estirpes classificadas como *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* ou *A. niger*. Optou-se assim por desenhar *primers* específicos para grupos de espécies relacionadas de *Aspergillus*, em relação aos quais as espécies atrás referidas são as principais representantes (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. *Primers* desenhados neste trabalho, com base na região ITS, para espécies de *Aspergillus* clinicamente relevantes

Designação do <i>primer</i>	Sequência (5' – 3')	Espécies alvo	Fragmentos amplificados ¹
Aflav_F	cca cga act ctg tct gat cta g	<i>A. flavus</i> (+ <i>A. parasiticus</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. sojae</i> , etc.)	595 + 439
Afum_R	ctg cat act ttc aga aca gcg	<i>A. fumigatus</i> (+ <i>A. brevipes</i> , etc.)	597 + 188
Anidul_R	ccg ccg aag caa cag tg	<i>A. nidulans</i> (+ <i>A. versicolor</i> , etc.)	570 + 98
Anig_R	ggc caa tcc tac aga gca tg	<i>A. niger</i> (+ <i>A. ibericus</i> , etc.)	599 + 505
Ater_R	tgc aag ctt tca gaa cag gg	<i>A. terreus</i>	608 + 187

¹Fragmentos esperados em reacções de PCR usando uma mistura dos dois *primers* universais (ITS1 + ITS4) e cada um dos *primers* específicos (o fragmento com maior peso molecular corresponde à amplificação da região ITS com os *primers* universais)

Cada espécie, ou conjunto de espécies relacionadas, pode ser teoricamente identificada em reacções de PCR usando uma mistura com o *primer* específico respectivo e um dos *primers* universais ITS1 ou ITS4, dependendo da orientação do *primer* específico: Aflav_F + ITS4 (*A. flavus*: fragmento

específico com 439 pb); Afum_R + ITS1 (*A. fumigatus*: fragmento específico com 188 pb); Anidul_R + ITS1 (*A. nidulans*: fragmento específico com 98 pb); Anig_R + ITS1 (*A. niger*: fragmento específico com 505 pb); e Ater_R + ITS1 (*A. terreus*: fragmento específico com 187 pb). A especificidade de cada *primer* específico para as espécies-alvo foi avaliada através de reacções de PCR. Em cada reacção foram usadas as misturas de *primer* específico e *primer* universal respectivo (ITS1 ou ITS4), usando como DNA molde amostras de espécies alvo e de controlo negativo de *Aspergillus*.

Num teste prévio, foi avaliado se as alíquotas de solução de DNA molde das estirpes de *Aspergillus* em estudo estavam em boas condições. Foram, assim, realizadas reacções de PCR com essas alíquotas apenas com os *primers* universais ITS1 e ITS4 (Fig. 3.1).

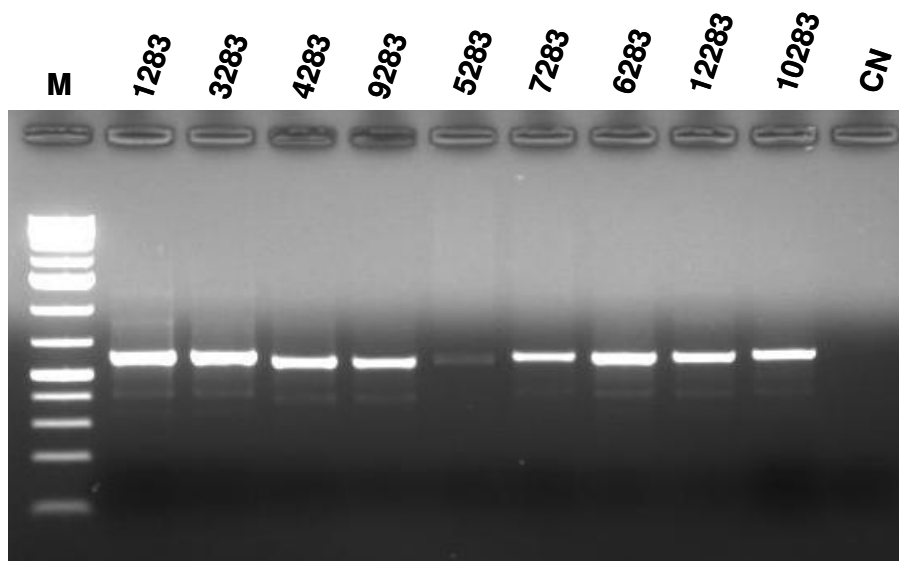


Fig. 3.1. Resultado da amplificação com os *primers* universais ITS1 e ITS4 a partir das soluções de DNA das várias estirpes de *Aspergillus* em estudo: 1283 (*A. versicolor*); 3283 (*A. flavus*); 4283 e 9283 (*A. nidulans*); 5283 e 7283 (*A. fumigatus*); 6283 e 12283 (*A. niger*); e 10283 (*A. terreus*). M - marcador de pesos moleculares de 100 pb (GeneRuler™); CN – Controlo Negativo.

Com a excepção da estirpe 5283, pertencente à espécie *A. fumigatus*, todas as estirpes testadas apresentaram sempre bandas intensas correspondentes ao fragmento universal amplificado (região ITS). A extracção de DNA a partir da cultura da estirpe 5283 revelou-se sempre muito pouco

eficiente em todas as experiências em que tal procedimento foi efectuado. Na realidade, vários autores têm descrito a dificuldade da extracção de DNA a partir de culturas de *Aspergillus*, com especial ênfase para a espécie *A. fumigatus* (ver Cap. II).

As misturas de *primer* específico e *primer* universal respectivo foram em seguida testadas, em reacções de PCR separadas. Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 3.2. Com estas experiências observou-se para o *primer* específico Aflav_F, que houve uma correcta amplificação com a respectiva espécie-alvo *A. flavus* (estirpe 3283). No entanto, observou-se também uma amplificação forte com a estirpe de *A. versicolor* usada (1283). Mais do que uma amplificação cruzada com esta espécie, os nossos resultados apontam antes para uma contaminação desta estirpe com DNA de *A. flavus*. As restantes espécies de *Aspergillus* mostraram também uma amplificação mais fraca com estes *primers*, o que poderá estar relacionado com as condições relativamente pouco restritivas usadas nas reacções de PCR. Para o *primer* específico Afum_R houve uma correcta amplificação para a estirpe de *A. fumigatus* testada (7283). No entanto, foram amplificadas também para esta estirpe algumas bandas não específicas apresentando outros pesos moleculares. Também a estirpe de *A. terreus* (10283) testada apresentou amplificação não específica com este *primer*. O *primer* específico Ater_R permitiu a amplificação correcta da estirpe de *A. terreus* (10283), observando-se ainda uma amplificação não específica, mas muito menos intensa, com a estirpe de *A. flavus*. O *primer* Anid_R permitiu a amplificação correcta com as estirpes de *A. nidulans* (3283) e de *A. versicolor* (1283). No entanto, foi também observada uma amplificação não específica com a estirpe de *A. niger* (6283). Por último, o *primer* Anig_R permitiu apenas a amplificação específica da estirpe de *A. niger* (6283).

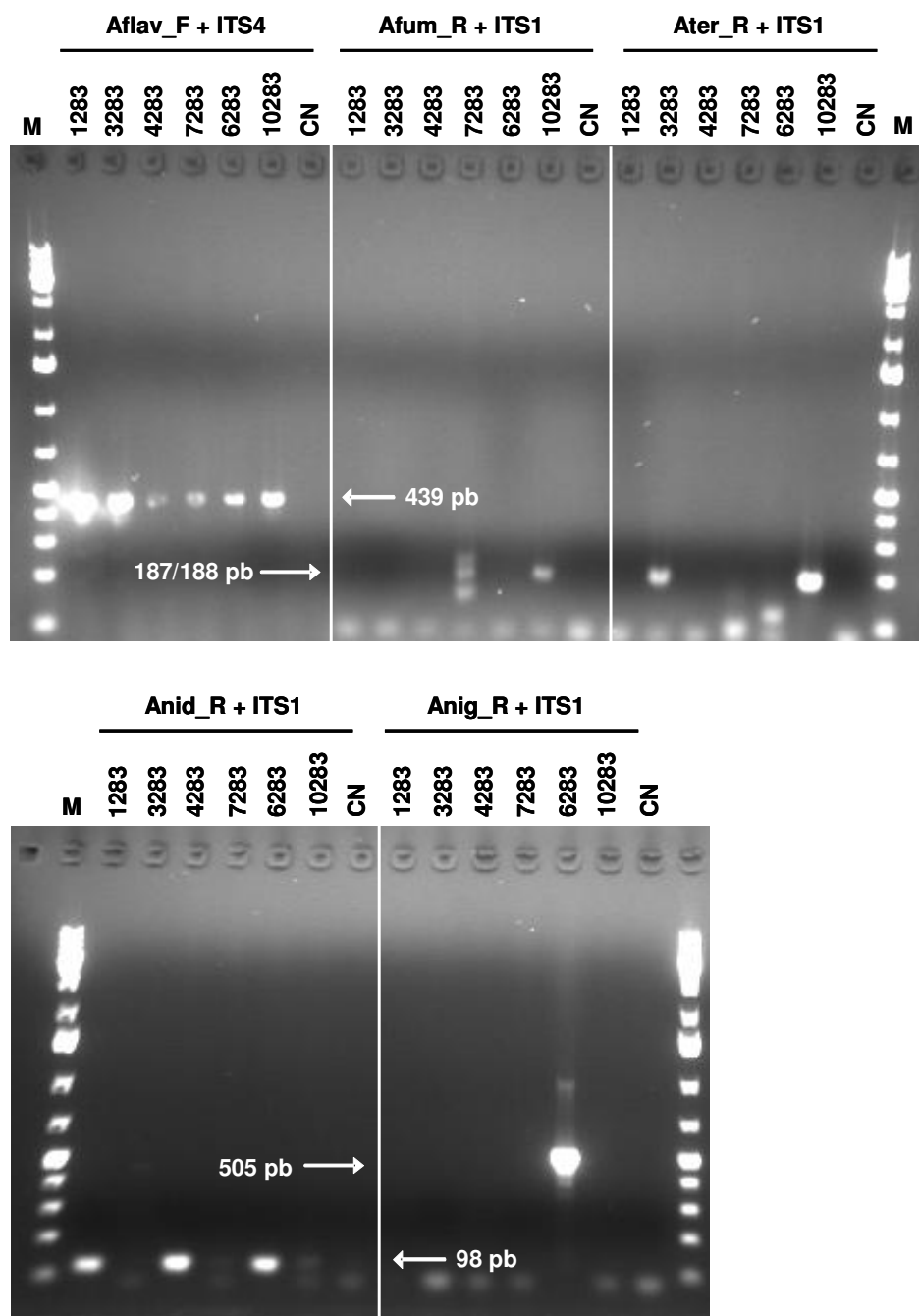


Fig. 3.2. Reacções de PCR com o *primer* específico e o respectivo *primer* universal em misturas reaccionais separadas. Estirpes: 1283 (*A. versicolor*); 3283 (*A. flavus*); 4283 (*A. nidulans*); 7283 (*A. fumigatus*); 6283 (*A. niger*); e 10283 (*A. terreus*). M - marcador de pesos moleculares de 100 pb (GeneRulerTM); CN – Controlo Negativo.

Os resultados preliminares obtidos com as experiências anteriores sugerem que os *primers* desenhados permitem a amplificação específica de DNA a partir das respectivas espécies alvo. No entanto, a ocorrência de algumas amplificações não específicas com espécies não alvo de *Aspergillus* indicam que a reacção de PCR precisa ainda de ser ajustada de modo a aumentar a especificidade da mesma. Apenas após este passo de optimização das reacções de PCR individuais se poderá passar ao desenvolvimento de misturas de *primers* específicos, em reacções de PCR-*multiplex*, de modo a permitir a identificação das diferentes espécies alvo de *Aspergillus*.

CAPÍTULO IV

Considerações finais

Capítulo IV

4.1 Considerações finais

Cerca de 30 espécies do género *Aspergillus* são consideradas patogénicas, podendo causar a aspergilose. Têm sido reportadas diferenças significativas entre a aspergilose e o respectivo tratamento de acordo com a espécie responsável pela infecção. As espécies de *Aspergillus* seleccionadas para este trabalho foram as que mais se detectaram associadas a casos de infecção no decorrer dos últimos anos, sendo *Aspergillus fumigatus* a mais identificada em amostras de pacientes. As espécies *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. terreus* também foram bastante encontradas. A correcta identificação das espécies de *Aspergillus* é ainda hoje bastante morosa, pois os métodos convencionais padrão para a identificação requerem o isolamento e o crescimento do fungo. As técnicas de diagnóstico molecular constituem uma alternativa rápida e fiável para a identificação das espécies de *Aspergillus*, que poderá inclusivamente ser directamente aplicada a amostras clínicas do indivíduo.

A sensibilidade das reacções de PCR para a detecção e identificação de fungos patogénicos depende de uma lise eficiente das células do fungo na amostra e da purificação do seu DNA, libertando-o também de inibidores da reacção. É igualmente importante ter o máximo cuidado no manuseamento das amostras durante a extracção de DNA para não haver qualquer tipo de contaminação, incluindo com esporos de *Aspergillus* que são ubíquos no ambiente. Os nossos resultados apontam, tal como acontece com outros autores (Karakousis *et al.* 2005), para que não existe um método simples e universal para lisar as células e extrair DNA genómico de modo eficiente a partir de todas as espécies de fungos. Existem muitos protocolos disponíveis na literatura para extracção de DNA, mas são na maior parte das vezes adaptados para espécies ou grupos específicos de espécies de fungos. Cada laboratório adapta normalmente o melhor protocolo de extracção, associado ao seu laboratório, dependendo da sua rotina e do melhor custo associado ao método. Neste trabalho experimental, a extracção de ácidos nucleicos a partir de culturas de *Aspergillus* foi obtida com maior sucesso através do método denominado de AZ. Este método foi concebido de modo caseiro,

sem uso de qualquer tipo de aplicação comercial, tornando-se assim pouco dispendioso mas relativamente eficiente.

Para a identificação das espécies de *Aspergillus* através de reacção de PCR foi seleccionada a região ITS para o desenho dos respectivos *primers* específicos. Esta região apresenta diferenças nucleotídicas significativas entre as espécies de *Aspergillus* seleccionadas para estudo e que têm sido mais identificadas a partir de amostras clínicas. Henry *et al.* (2000) e Hinrikson *et al.* (2005) realizaram estudos comprovativos da eficiência desta região genómica para a diferenciação das espécies de *Aspergillus*. Os *primers* específicos para cada espécie foram desenhados e testados em reacções de PCR separadas. Os resultados preliminares obtidos com os *primers* revelaram-se promissores para a identificação das várias espécies, mas as reacções de PCR requerem ainda alguma optimização para o melhoramento da sua especificidade. A utilização futura destes *primers* em reacções de PCR-*multiplex* para a identificação simultânea das várias espécies de *Aspergillus* poderá assim vir a ser possível.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ABARCA, M. L., 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, **17**: S79–S84.
- BALAJEE, S. A., HOUBRAKEN, J., VERWEIJ, P. E., HONG, S-B., YAGHUCHI T., VARGA J., SAMSON, R.A., 2007a. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in Mycology*, **59**: 39–46.
- BALAJEE, S. A., SIGLER, L., BRANDT, M. E., 2007b. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Medical Mycology*, **45**: 475–490.
- BEAUVAIS, A., LATGE, J. P., 2001. Membrane and cell wall targets in *Aspergillus fumigatus*. *Drug resistance updates*, **4**: 38–49.
- BERGOLD, A. M., GEORGIADIS, S., 2004. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. *Visão Acadêmica*, **5**: 159–172.
- BIZZETTO, A., HOMECHIN, M., DESTRO, D., 1997. Comparação de substratos utilizados para detecção de toxinas por *Aspergillus flavus* em soja. *Unimar*, **19**: 709–719.
- BOWMAN, S. M., FREE, S. J., 2006, The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, **28**: 799–808.
- BURIK, J. A. H. V., COLVEN, R., SPACH, D. H., 1998. Cutaneous Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**: 3115–3121.
- CANO, J., SOLER, M., 2000. Epidemiología molecular aplicada a la detección de brotes de aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, **17**: S97–S99.
- CARVALHO, A., COSTA-DE-OLIVEIRA, S., MARTINS, M. L., PINA-VAZ, C., RODRIGUES, A. G., LUDOVICO, P., RODRIGUES, F., 2007. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology*, **1**: 1–9.
- CRUZ-PEREZ, P., BUTTNER, M. P., STETZENBACH, 2001. Detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* in pure culture using polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, **15**: 81–88.
- DIOMEDI, P. A., 2004. Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. *Revista chilena de infectología*, **21**: 89 – 101.
- ESPINEL-INGROFF, A., 1996. History of Medical Mycology in the United States. *Clinical microbiology reviews*, **9**: 235 – 272.
- FREDRICKS, D. N., SMITH, C., MEIER, A., 2005. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*, **43**: 5122 – 5128.
- FRISVAD, J.C., LARSEN, T.O., DE VRIES, R., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., CABAÑES, F.J., EHRLICH, K., SAMSON, R.A., 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*, **59**: 31 – 37.
- GARCÍA-RUIZ, J. C., AMUTIO, E., PONTÓN, J., 2004. Infección fúngica invasora en pacientes inmunodeficientes. *Revista Iberoamericana de Micología*, **21**: 55 – 62.
- GAVALDA, J., LEN, O., SAN JUAN, R., AGUADO, J. M., FORTUN, J., LUMBRERAS, C., MORENO, A., MUNOZ, P., BLANES, M., RAMOS, A., RUFÍ, G., GURGUI, M., TORRE-CISNEROS, J., MONTEJO, M., CUENCA-ESTRELLA, M., RODRIGUEZ-

- TUDELA, J. L., PAHISSA, A., 2005. Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: A case-control study. *Clinical Infectious Diseases*, **41**: 52 – 59.
- GEISER, D.M., KLICH, M.A., FRISVAD, J.C., PETERSON, S.W., VARGA, J., SAMSON, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, **59**: 1–10.
 - GILES, P. F., SOANES, D. M., TALBOT, N. J., 2003. A relational database for the discovery of genes encoding amino acid biosynthetic enzymes in pathogenic fungi. *Comparative and Functional Genomics*, **4**: 4 – 15.
 - GRIFFITHS, L. J., ANYIM, M., DOFFMAN, S. R., WILKS, M., MILLAR, M. R., AGRAWAL, S. G., 2006. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *Journal of Medical Microbiology*, **55**: 1187–1191.
 - HENRY, T., IWEN, P. C., HINRICHS, S. H., 2000. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal of microbiology*, **38**: 1510 – 1515.
 - HINRIKSON, H. P., HURST, S.F., AGUIRRE, L. de, MORRISON, C.J., 2005a. Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, **1**: S129 – S137.
 - HINRIKSON, H. P., HURST, S. F., LOTT, T. J., WARNOCK, D. W., MORRISON, C. J., 2005b. Assessment of Ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal Transcribed Spacer 1, and Internal Transcribed Spacer 2 Regions as Targets for Molecular Identification of Medically Important *Aspergillus* Species. *Journal of microbiology*, **43**: 2092 – 2103.
 - HICKEY, P.C., Swift, S.R., Roca, M.G. & Read, N.D., 2005. *Methods in Microbiology* (Second Ed.), Elsevier, Amsterdam, 282 pp
 - HOHL, T. M., FELDMESSER, M., 2007. *Aspergillus fumigatus*: Principles of Pathogenesis and Host Defense. *Eukaryotic cell*, **6**: 1953 – 1963.
 - INÁCIO, J., 2003. Ocorrência e diversidade de leveduras no filopiano de plantas seleccionadas do Parque Natural da Serra da Arrábida. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
 - JIN, J., LEE, Y.-K., WICKES, B. L., 2004. Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of clinical microbiology*, **42**: 4293 – 4296.
 - KARAKOUSIS, A., TAN, L., ELLIS, D., ALEXIOU, H., WORMALD, P. J., 2005. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological methods*, **65**: 38 – 48.
 - KHOT, P. D., KO, D. L., HACKMAN, R. C., FREDRICKS, D. N., 2008. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid. *BMC infectious diseases*, **8**: 1-13.
 - KLAASSEN, C. H. W., OSHEROV, N., 2007. *Aspergillus* strain typing in the genomics era. *Studies in Mycology*, **59**: 47 – 51.
 - KURHADE, A. M., DESHMUKH, J. M., FULE, R. P., CHANDE, C., AKULWAR, S., 2002. Mycological and serological study of pulmonary aspergillosis in central Índia. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **20**: 141-144.
 - LAI, C. C., TAN, C. K., HUANG, Y. T., SHAO, P. L., HSUEH, P. R., 2008. Current challenges in the management of invasive fungal infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **14**: 77 – 85.

- LATGÉ, J. P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*, **66**: 279 – 290.
- LASS-FLORL, C., SALZER, G. M., SCHMID, T., RABL, W., ULMER, H., DIERICHI, M. P., 1999. Pulmonary *Aspergillus* colonization in humans and its impact on management of critically ill patients. *British Journal of Haematology*, **104**: 745 – 747.
- LASS-FLORL, C., GUNSILIUS, E., GASTL, G., BONATTI, H., FREUND, M. C., GSCHWENDTNER, A., KROPSHOFER, G., DIERICH, M. P., PETZER, A., 2004. Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. *Journal of clinical microbiology*, **42**: 4154 – 4157.
- LAZARUS, A. A., THILAGAR, B., MCKAY, S. A., 2008. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Disease a month*, **54**: 547 – 564.
- LEENDERS, A. C., BELKUM, A. V., BEHRENDT, M., LUIJENDIJK, A. D., VERBRUGH, H. A., 1999. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. *Journal of clinical microbiology*, **37**: 1752 – 1757.
- LOEFFLER, J., HEBART, H., BIALEK, R., HAGMEYER, L., SCHMIDT, D., SEREY, F. P., HARTMANN, M., EUCKER, J., EINSELE, H., 1999. Contaminations occurring in fungal PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, **37**: 1200 – 1202.
- LOFFLER, J., HEBART, H., SCHUMACHER, U., REITZE, H., EINSELE, H., 1997. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *Journal of clinical microbiology*, **35**: 3311 – 3312.
- LOGOTHETI, M., KOTSOVILI-TSELENIA, A. G., LEGAKIS, N. I., 2008. Multiplex PCR for the discrimination of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*. *Journal of microbiological methods*, **76**: 209 – 21.
- LOPES, A. J., JANSEN, U., CAPONE, D., JANSEN, J. M., 2004. Aspergiloses pulmonares. *Pulmão RJ*, **13**: 34 – 44.
- LUO, G., MITCHELL, T. G., 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, **40**: 2860 – 2865.
- MAY, S. G., ADAMS, T. H., 1997. The importance of fungi to man. *Genome research*, **7**: 1041 – 1044.
- MULLER, F. M. C., WERNER, K. E., KASAI, M., FRANCESCONI, A., CHANOCK, S. J., WALSH, T. J., 1998. Rapid extraction of genomic DNA from medically important yeasts and filamentous fungi by high-speed cell disruption. *Journal of clinical microbiology*, **36**: 1625 – 1629.
- NUNLEY, D. R., GAL, A. A., VEGA, J. D., PERLINO, C., SMITH, P., LAWRENCE, E. C., 2002. Saprophytic fungal infections and complications involving the bronchial anastomosis following human lung transplantation. *Chest Journal*, **122**: 1185 – 1191.
- PITT, J.I., SAMSON, R.A., 2007. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. *Studies in Mycology*, **59**: 67 – 70.
- RADFORD, S. A. , JOHNSON, E. M., LEEMING, J. P., MILLAR, M. R., CORNISH, J. M., FOOT, A. B. M., WARNOCK, D. W., 1998. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. *Journal of clinical microbiology*, **36**: 1294 – 1299.

- RAI, S. P., PANDA, B. N., BHARGAVA, S., 2004. Treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with Fluconazole and Itraconazole. *Medical journal armed forces of India*, **60**: 128 – 130.
- RAMOS, A. O., MEDEIROS, A. R. C., PAULISTA, P. P., ABBOUD, C. S., MENEGHELO, Z. M., 2002. Infecção por *Aspergillus* em aorta ascendente em portador de prótese aórtica e mitral. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, **81**: 417 – 418.
- RICHARDSON, M. D., WARNOCK, D. W., 2004. Fungal infection diagnosis and management, (Third Ed.) Blackwell publishing, Oxford, 366 pp.
- ROBINSON, L. A., REED, E. C., GALBRAITH, T. A., ALONSO, A., MOULTON, A. L., FLEMING, W. H., 1995. Pulmonary resection for invasive *Aspergillus* infections in immunocompromised patients. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **109**: 1182 – 1197.
- SAFDAR, A., 2007. Difficulties with fungal infections in acute myelogenous leukemia patients: Immune enhancement strategies. *The oncologist*, **12**: 2 – 6.
- SALEZ, F., BRICHET, A., DESURMONT, S., GROSBOIS, J. M., WALLAERT, B., TONNEL, A. B., 1999. Effects of Itraconazole therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest*, **116**: 1665 – 1668.
- SAMSON, R.A., HONG, S., PETERSON, S.W., FRISVAD, J.C., VARGA, J., 2007a. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*, **59**: 147 – 203.
- SAMSON, R.A., NOONIM, P., MEIJER, M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J.C, VARGA, J., 2007b. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, **59**: 129 – 145.
- SAMSON, R.A., VARGA, J., WITIAK, S.M., GEISER, D.M., 2007c. The species concept in *Aspergillus*: recommendations of an international panel. *Studies in Mycology*, **59**: 71 – 73.
- SOLÉ, A., MORANT, P., SALAVERT, M., PEMÁN, J., MORALES, P., THE VALENCIA LUNG TRANSPLANT GROUP, 2005. *Aspergillus* infections in lung transplant recipients: risk factors and outcome. *Clinical microbiology infections*, **11**: 359–365.
- SOLÉ, A., SALAVERT, M., 2008. Fungal infections after lung transplantation. *Transplantation Reviews*, **22**: 89 – 104.
- SMART, M. G., SHOTWELL, O. L., CALDWELL, R. W., 1990. Pathogenesis in *Aspergillus* ear rot of maize: Aflatoxin B₁ levels in grains around wound-inoculation sites. *Phytopathology*, **80**: 1283 – 1286.
- SUSUKI, S., TAKETANI, H., KUSUMOTO, K.-I., KASHIWAGI, Y., 2006. High – throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *Journal of bioscience and bioengineering*, **102**: 572 – 574.
- WALLACE, J. M., LIM, R., BROWDY, B. L., HOPEWELL, P. C., GLASSROTH, J., ROSEN, M. J., REICHMAN, L. B., KVALE, P. A., THE PULMONARY COMPLICATIONS OF HIV INFECTION STUDY GROUP, 1998. Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* in respiratory specimens from persons with HIV disease. *Chest*, **114**: 131 – 137.
- WINGARD, J. R., RIBAUD, P., SCHLAMM, H. T., HERBRECHT, R., 2008. Changes in causes of death over time after treatment for invasive aspergillosis. *American Cancer Society*, **112**: 2309 – 2312.

- ZHAO, J., KONG, F., LI, R., WANG, X., WAN, Z., WANG, D., 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of clinical microbiology*, **39**: 2261 – 2266.